



Universidade Nova de Lisboa

**Imunidade e Especiação: o papel do gene TEP1 na
divergência entre formas moleculares do vector de
malária *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae)**

Vasco Miguel Ferreira Gordicho

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
PARASITOLOGIA MÉDICA**

OUTUBRO DE 2012



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**Imunidade e Especiação: o papel do gene TEP1 na
divergência entre formas moleculares do vector de malária**
***Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae)**

Vasco Miguel Ferreira Gordicho

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à
obtenção do grau de Mestre em Parasitologia Médica.

Orientador: Prof. Doutor João Pinto (UEIPM/IHMT/UNL)

OUTUBRO DE 2012

Ao meu pai

AGRADECIMENTOS

Começo pelas duas pessoas mais importantes da minha vida: os meus pais. A eles devo tudo e só posso agradecer todo o orgulho e confiança que sempre depositaram em mim. O melhor elogio que vos posso fazer é que o vosso amor foi o suporte de todo este percurso. Confiaram sempre nas minhas escolhas e isso é algo que vai ficar no meu coração para sempre.

Não esqueço também os meus avós. A pessoa que sou hoje tem muito daquilo que outrora me ensinaram. O orgulho que tenho hoje na minha pessoa tem muito do orgulho que sempre tiveram em mim.

Ao meu Orientador, Prof. Dr. João Pinto, por tudo o que me ensinou e por todas as reprimendas que me deu. Tudo isso só serviu para melhorar as minhas capacidades. Obrigado também por me mostrar que há sempre maneira de resolver os problemas.

Aos professores da Unidade de Parasitologia Médica do IHMT, porque estiveram sempre disponíveis para me ajudar e ensinar.

À Dra. Elena Levashina, por ter gentilmente cedido o protocolo de genotipagem do gene TEP1.

Ao Dr. Emiliano Mancini, por ter gentilmente cedido o protocolo de sequenciação do gene TEP1 e pelo aconselhamento prestado na análise dessas sequências.

A todos os amigos que fiz no IHMT, obrigado por qualquer ajuda que me tenham dado na execução deste trabalho, mas acima de tudo, obrigado por tornarem muitos dos momentos passados nesta casa em momentos que ficarão na minha memória. Um agradecimento especial aos membros de uma fabulosa equipa: Leonor Pinho, Teresa Nazareth e Gonçalo Seixas.

Um gigantesco obrigado também a uma pessoa que deve ter uma colecção enorme de agradecimentos em teses, o Engenheiro José Luís Vicente. E são todos inteiramente merecidos. Toda a ajuda, toda a disponibilidade e toda a paciência que sempre teve para com cada um de nós são fenomenais. E ainda tem tempo para ser nosso amigo e para tornar os nossos dias mais divertidos.

Aos meus colegas de Mestrado, por tudo e por mais alguma coisa. Por todas as batalhas que atravessámos nestes últimos dois anos, por toda a ajuda, por toda a

companhia, por toda a amizade, por toda a brincadeira, por todos os momentos sérios em que fomos suporte uns dos outros. Muito obrigado Ana Sousa, Ana Filipa Teixeira, Isa Pires, Idalécia Moiane, Arlete Troco, Lis Coelho, Mónica Guerra e Miguel Landum. Sei também que não vão ficar surpreendidos nem chateados se eu fizer um agradecimento especial a um de vós: Mário da Costa, sem ti estes dois anos não tinham tido metade da piada. Sem ti, estes dois anos não tinham tido o mesmo significado.

Ao grupo fabuloso de pessoas que durante 4 anos, fez da sala de BCM uma segunda casa. Agradeço-vos por todos os momentos passados naquele lugar e também por toda a amizade que construímos desde o tempo de caloiros. Muitos de vós mereceriam um agradecimento especial, mas penso que não ficarão ofendidos se destacar aqui três pessoas: obrigado Cátia Santos, por me teres acolhido desde o primeiro momento; obrigado Viviana Correia, por teres tornado bem mais agradáveis aquelas viagens de comboio e obrigado Nadine Hecht, por seres a minha princesa.

Ao grupo fantástico de pessoas que me recebeu de braços abertos em Avezzano, porque hoje posso dizer que Itália também é a minha casa. *Grazie mille ragazzi*.

A todos os meus amigos, por isso mesmo, por me darem a oportunidade de vos poder chamar de amigos. Obrigado acima de tudo pela paciência e compreensão nos momentos em que esta tese ocupou mais tempo da minha mente do que vocês próprios. Um especial obrigado à Raquel Guerreiro, simplesmente por seres a minha melhor amiga, e ao Pedro Garcia e ao Tiago Raposo, porque são dois irmãos e porque eu só posso agradecer o facto de vos ter conhecido um dia.

À Benilde e ao Nuno Cordeiro, porque hoje posso dizer que já são parte da minha família.

E por último, mas não última em importância, à Fernanda Cordeiro: obrigado por teres aceitado o meu coração. Guarda-o bem junto do teu e nunca o percas.

Este trabalho teve o apoio financeiro do projecto “*INFRAVEC: Research capacity for the implementation of genetic control of mosquitoes*”. FP7-INFRASTRUCTURES-2008-1/EU (GA nº 228421); e do Projecto “*Especiação com fluxo genético e genes de isolamento no mosquito Anopheles gambiae (Diptera: Culicidae)*”. FCT/MEC (PTDC/BIA-EVF/120407/2010).

RESUMO

Imunidade e Especiação: o papel do gene TEP1 na divergência entre formas moleculares do vector de malária *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae)

Vasco Miguel Ferreira Gordicho

Anopheles gambiae s.s., principal vector de malária em África, atravessa um processo de especiação incipiente representado por duas formas moleculares, designadas por M e S. Os mecanismos que conduziram a este processo continuam por esclarecer, mas verificou-se que a forma M está associada a biótopos larvares permanentes, com maior pressão de predadores e agentes patogénicos, e a forma S a criadouros temporários, onde essa pressão é menor. Recentemente, foi sugerida a importância do gene TEP1, envolvido na resposta imunitária do mosquito a agentes patogénicos, neste processo de especiação. Em locais onde M e S ocorrem em simpatria, observaram-se elevadas frequências de um alelo associado à resistência à infecção por *Plasmodium* sp na forma M e a sua ausência na forma S. Para testar a possibilidade da frequência elevada deste alelo na forma M ser uma consequência de pressão selectiva na fase larvar, foram analisados os padrões de variação do gene TEP1 entre formas moleculares em diferentes criadouros larvares.

Em 2010, foram feitas colheitas entomológicas de larvas em criadouros permanentes e temporários e de adultos em Antula, Guiné-Bissau, um dos raros locais onde se observaram elevadas frequências de hibridização entre M e S. Foi feita a identificação molecular das espécies e formas moleculares do complexo *An. gambiae* através dos marcadores IGS e SINE200X1.6. O gene TEP1 foi genotipado por PCR-RFLP e um fragmento de 450pb do domínio TED deste gene foi sequenciado.

Surpreendentemente, a espécie *Anopheles arabiensis* foi identificada pela primeira vez na região de Antula. Este achado pode ser resultado de uma introdução recente deste vector nesta região.

Problemas técnicos na identificação molecular das larvas do criadouro permanente impediram a análise dos padrões de variação do gene TEP1 entre diferentes tipos de criadouros larvares. Observou-se uma elevada frequência do alelo susceptível S1 do gene TEP1 e baixas frequências dos alelos resistentes R1 e R2. Apesar da elevada taxa de hibridação entre formas, o alelo R1 ocorreu associado exclusivamente à forma M que, consequentemente, apresentou uma maior diversidade genética, possivelmente devido a um processo de selecção balanceada. A forma S apresentou uma diversidade genética inferior, possivelmente como consequência de um processo de selecção positiva.

PALAVRAS-CHAVE: *Anopheles gambiae*, formas moleculares, criadouros larvares, especiação incipiente, gene TEP1.

ABSTRACT

Immunity and Speciation: the role of the TEP1 gene in the divergence between the molecular forms of malaria vector *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae)

Vasco Miguel Ferreira Gordicho

The main malaria vector in Africa, *Anopheles gambiae* s.s., is undergoing a process of incipient speciation, represented by two molecular forms denoted M and S. The mechanisms that lead to this process are not entirely understood, but it was shown that M form is associated with permanent breeding sites, with higher levels of predation and/or pathogen pressure, whereas S form is associated with temporary breeding sites, where this pressure is lower. Recently, it was suggested that the TEP1 gene, a gene involved in the mosquito immune response, may have a role in this speciation process. In areas where M and S occur in sympatry, high frequencies of an allele associated with *Plasmodium* sp infection resistance were reported in the M form, while this allele was absent in the S form.

To test the possibility that this high frequency in the M form is a consequence of selection acting on larval stages, genetic variation patterns at the TEP1 gene between molecular forms and different breeding sites was analyzed.

In 2010, larval sampling at temporary and permanent breeding sites and adult sampling was performed in Antula, Guinea Bissau, one of the rare places where high levels of hybridization between M and S forms were found. Molecular identification of species and molecular forms within the *An. gambiae* complex were performed using IGS and SINE200X1.6 markers. The TEP1 gene was genotyped and a 450bp fragment from the TED domain of this gene was sequenced.

Surprisingly, *An. arabiensis* was identified for the very first time in Antula region. This finding may correspond to a recent introduction of this vector species in this region.

It was impossible to analyze the variation patterns of TEP1 gene between different breeding sites due to technical problems in the identification of larvae from permanent breeding sites. High frequency of TEP1*S1 allele was observed in this region, while low frequencies of R1 and R2 alleles were observed. In spite of the high hybridization levels, the R1 allele was exclusively associated with M form, which presented a higher genetic diversity, probably as consequence of a process of balancing selection. The S form presented a lower genetic diversity, probably as consequence of a process of positive selection.

KEY WORDS: *Anopheles gambiae*, molecular forms, breeding sites, incipient speciation, TEP1 gene.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	III
RESUMO	V
ABSTRACT	VI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IX
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 - Malária: considerações gerais.....	2
1.1.1 – O Parasita	2
1.1.1.1 - Taxonomia.....	2
1.1.1.2 – Ciclo de vida.....	2
1.1.2 – O Vector	3
1.1.2.1 – Taxonomia	3
1.1.2.2 – Ciclo de vida e morfologia	4
1.1.2.3 – Comportamento	6
1.2 – O complexo <i>Anopheles gambiae</i>	7
1.2.1 – Identificação	7
1.2.2 – Distribuição geográfica	8
1.2.3 - Bioecologia e comportamento.....	9
1.2.4 – Especiação e evolução	11
1.2.4.1 – Especiação incipiente em <i>Anopheles gambiae</i> s.s.	12
1.2.5 – O complexo <i>Anopheles gambiae</i> na Guiné-Bissau	15
1.3 – O sistema imunitário do mosquito	16
1.3.1 – Considerações gerais	16
1.3.2 – A proteína TEP1	18
1.4 – Objectivos	20
2. MATERIAIS E MÉTODOS	21
2.1 – República da Guiné-Bissau.....	22
2.2 – Material biológico: captura e conservação.....	23
2.3 – Extracção, quantificação e pureza do DNA genómico.....	25
2.4 – Análises moleculares	26
2.4.1 – Identificação de espécies e formas moleculares do complexo <i>Anopheles gambiae</i>	26

2.4.2 – Genotipagem do gene TEP1 por PCR-RFLP	28
2.4.3 – Sequenciação do gene TEP1	30
2.5 – Análise das sequências do gene TEP1.....	31
2.6 – Análise Estatística	33
3. RESULTADOS.....	34
3.1 – Descrição da amostra	35
3.2 – Identificação molecular	35
3.3 - Distribuição de espécies e formas moleculares por método de colheita	37
3.4 – Genotipagem do gene TEP1 por PCR-RFLP	39
3.5 – Sequenciação e diversidade do gene TEP1	40
4. DISCUSSÃO.....	44
4.1 – Identificação molecular	45
4.2 – Distribuição de espécies e formas moleculares	47
4.3 – Genotipagem do gene TEP1	48
4.4 – Sequenciação e diversidade do gene TEP1	49
5. CONCLUSÃO.....	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
ÍNDICE DE FIGURAS.....	65
ÍNDICE DE TABELAS	67

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA – *Bovine serum albumin* (Albumina de soro bovino)

CDC – *Centers for Disease Control*

ddH₂O – Água bidestilada

DNA – *Deoxyribonucleic acid* (Ácido desoxirribonucleico)

dNTP – *3'-deoxyribonucleotide triphosphate-5'* (3'- desoxirribonucleotídeo -5'-trifosfato)

IGS – *Intergenic spacer* (Espaçador intergénico)

IHMT – Instituto de Higiene e Medicina Tropical

IMP-PCR – *Intentional mismatch primers - Polymerase chain reaction* (Primers de mismatch intencional - reacção de polimerização em cadeia)

ITS – *Internal transcribed spacer* (Espaçador interno transcrito)

IR – *indoor resting* (captura de mosquitos adultos em repouso feitas no interior de habitações humanas)

mtDNA – *mitochondrial DNA* (DNA mitocondrial)

N – tamanho da amostra

Pb – Pares de bases

PCR – *Polymerase chain reaction* (Reacção de polimerização em cadeia)

PCR-RFLP – *Polymerase chain reaction - Restriction fragment length polymorphism* (Reacção de polimerização em cadeia – Polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição)

rDNA – *ribosomal DNA* (DNA ribossomal)

RNA – *Ribonucleic acid* (Ácido ribonucleico)

SINE – *Short interspersed element* (Elemento curto intercalado)

TBE – Tris/Borato/EDTA (solução tampão constituída por base Tris, ácido bórico e EDTA)

TED – *Thioester domain* (Domínio tioéster)

TEP – *Thioester-containing protein*

U – Unidades de enzima

UEIPM – Unidade de Ensino e Investigação em Parasitologia Médica

UNL – Universidade Nova de Lisboa

UV – Ultravioleta

WHO – *World Health Organization* (Organização Mundial de Saúde)

1. INTRODUÇÃO

1.1 - Malária: considerações gerais

A malária é uma doença parasitária que, nos humanos, pode ser causada por cinco espécies do género *Plasmodium*: *Plasmodium falciparum* Welch, 1987; *Plasmodium vivax* Grassi & Felletti, 1890; *Plasmodium ovale* Stephens, 1922; *Plasmodium malariae* Laveran, 1881 e *Plasmodium knowlesi* Sinton & Mulligan, 1933 (Despommier *et al.*, 2005). De entre estas espécies, que são transmitidas por mosquitos fêmea do género *Anopheles*, *P. falciparum* é responsável pela maioria dos casos severos e das mortes.

Estima-se que, em 2010, cerca de 3,3 milhares de milhão de pessoas estiveram em risco de contrair malária, com 81% dos casos e 91% das mortes a ocorrer na África Subsaariana (WHO, 2011). Dentro deste número, grávidas e crianças com menos de cinco anos foram os mais afectados por esta doença.

1.1.1 – O Parasita

1.1.1.1 - Taxonomia

As cinco espécies de *Plasmodium* responsáveis pela malária humana, podem ser classificadas como pertencendo ao Reino Protista, Filo Apicomplexa, Classe Hematozoa, Ordem Haemosporida, Família Plasmodiidae e Género *Plasmodium* (Ayala *et al.*, 1998). Este género caracteriza-se pela existência de uma fase assexual nos tecidos dos hospedeiros vertebrados e por uma fase sexual nos tecidos dos mosquitos vectores, pela produção de um pigmento derivado da hemoglobina dos eritrócitos do hospedeiro vertebrado e pela produção de esporozoítos infectantes no vector (Chiodini *et al.*, 2001).

1.1.1.2 – Ciclo de vida

O ciclo de vida das várias espécies responsáveis pela malária humana é muito semelhante, compreendendo duas fases: uma assexuada, ou esquizogónica, que ocorre no humano, e que pode ser dividida em fase de esquizogonia pré-eritrocitária e fase de esquizogonia eritrocitária; e outra sexual, ou esporogónica, que ocorre no mosquito vector (Figura 1.1) (Manson-Bahr & Bell, 1987; Braga & Fontes, 2001).

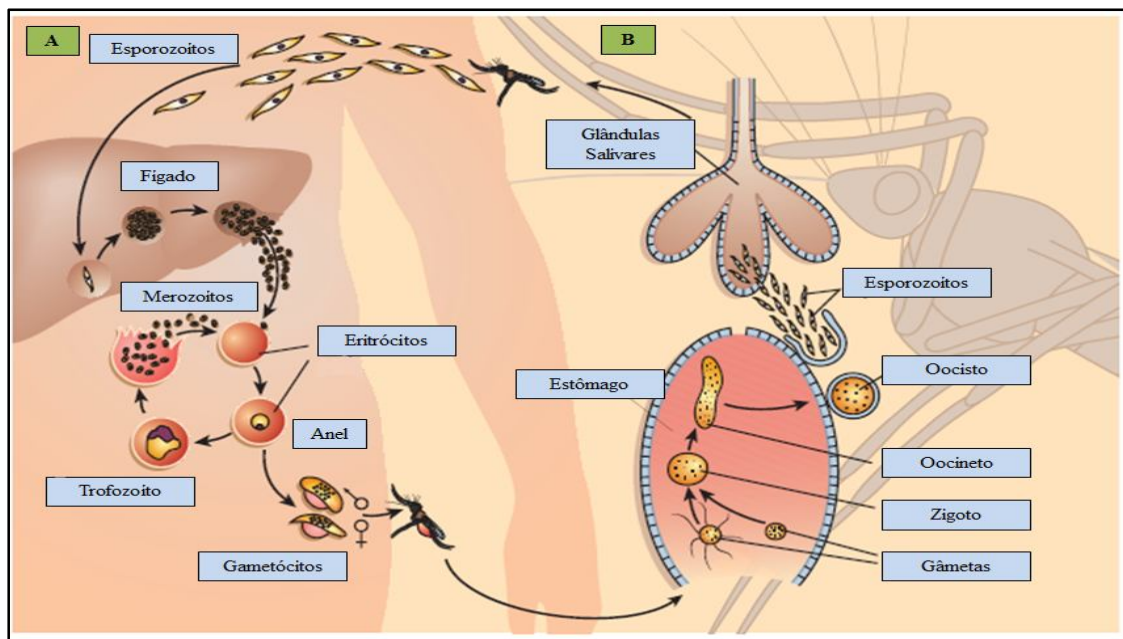


Figura 1.1 – Ciclo de vida dos parasitas responsáveis pela malária humana (adaptado de Wirth, 2002). **A. Fase assexuada ou esquizogônica.** Inicia-se quando o vector, ao efectuar uma refeição sanguínea, inocula esporozoítos no hospedeiro humano. Estes migram para o fígado, invadem os hepatócitos e diferenciam-se em esquizontes pré-eritrocitários ou hepáticos. Os esquizontes dividem-se por mitose originando merozoítos. Uma vez maduro, o esquizonte hepático rompe e liberta os merozoítos, que entram na circulação sanguínea. Esta fase é chamada de esquizogonia pré-eritrocitária. Já no sistema sanguíneo, os merozoítos invadem os eritrócitos, diferenciando-se em trofozoítos. No eritrócito, os trofozoítos vão desenvolver-se em esquizontes eritrocitários que, por mitose, originam merozoítos. Os merozoítos rompem o eritrócito e vão invadir novos eritrócitos. Esta fase é chamada de esquizogonia eritrocitária. Alguns merozoítos podem ainda diferenciar-se em gametócitos, as formas sexuais do parasita. **B. Fase sexual ou esporogônica.** Quando ingeridos por um mosquito vector numa refeição sanguínea, os gametócitos atingem o estômago e diferenciam-se em gâmetas masculinos (microgâmetas) e femininos (macrogâmetas). Os microgâmetas sofrem um processo de exflagelação e penetram os macrogâmetas, formando o zigoto, fase em que se dá o processo de meiose. Posteriormente, o zigoto diferencia-se em oocineto. Este atravessa o epitélio do estômago e diferencia-se em oocisto. A divisão mitótica desta estrutura origina os esporozoítos e, após o rebentamento do oocisto, estes migram até às glândulas salivares. Aqui, são inoculados no humano durante a refeição sanguínea do vector (Manson-Bahr, & Bell, 1897; Braga & Fontes, 2001).

1.1.2 – O Vector

1.1.2.1 – Taxonomia

Os vectores de malária humana podem ser classificados como pertencendo ao Reino Animalia, Filo Arthropoda, Classe Insecta, Ordem Diptera, Família Culicidae,

Subfamília Anophelinae e Género *Anopheles* (Richards & Davies, 1977). Dentro deste género existem sete subgéneros, destacando-se o subgénero *Cellia*, que inclui os principais vectores de malária da região Afrotropical (Harbach, 2012).

1.1.2.2 – Ciclo de vida e morfologia

O ciclo de vida do género *Anopheles*, tal como o de todos os mosquitos, ocorre em dois meios distintos, o aquático e o terrestre (Figura 1.2) e caracteriza-se pela existência de quatro fases: ovo, larva e pupa, que se desenvolvem no meio aquático, e adulto ou imago, que se desenvolve no meio terrestre (Service, 1993).

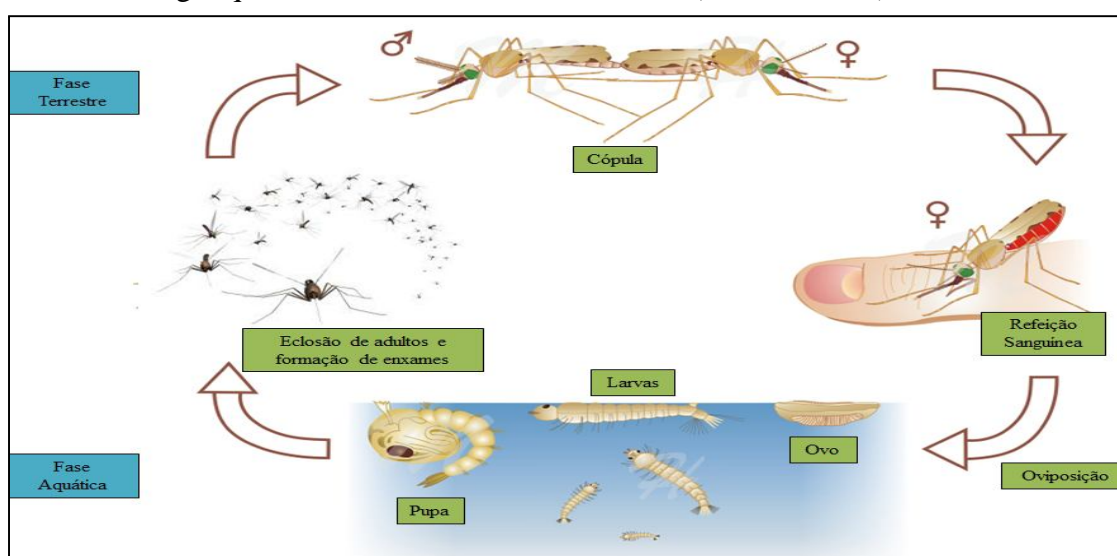


Figura 1.2 – Ciclo de vida dos mosquitos do género *Anopheles* (adaptado de BioGraphix, 2012 e Technonaturalist, 2012). A fase aquática inicia-se com a postura do ovo à superfície da água e da qual eclode a larva. Esta passa por quatro estados larvares (de L1 a L4) através de 3 mudas ou ecdises. As larvas L4 diferenciam-se em pupa por metamorfose. A pupa origina o adulto também por metamorfose. Após a emergência dos adultos, os machos formam enxames para os quais as fêmeas são atraídas. Após a cópula, as fêmeas efectuem pelo menos uma refeição sanguínea de modo a completarem a maturação dos ovos. Seguidamente, dá-se a oviposição (Service, 1993).

O ciclo inicia-se quando a fêmea deposita os ovos à superfície da água, nos designados criadouros ou biótopos larvares. Estes são sempre colecções de água mas as suas características variam bastante consoante as espécies ou mesmo populações dentro da mesma espécie. Os ovos possuem dois flutuadores laterais que lhes permite manterem-se à superfície da água.

As larvas que eclodem dos ovos têm o corpo dividido em cabeça, tórax e abdómen e caracterizam-se pela ausência de um sifão respiratório. As trocas gasosas dão-se através de espiráculos respiratórios presentes na face dorsal do 8º segmento do

abdômen. Deste modo, as larvas de *Anopheles* posicionam-se horizontalmente em relação à superfície da água (Figura 1.3C), o que as distingue das larvas de culicíneos. As larvas são móveis e alimentam-se de microorganismos e detritos em suspensão na água. As larvas passam por três mudas ou ecdises, dividindo a sua fase larvar em quatro estados larvares (definidos como L1 a L4). As larvas L4 sofrem uma metamorfose, originando as pupas.

O corpo da pupa é constituído por cefalotórax e abdômen e tem a forma de vírgula. As pupas não se alimentam mas são móveis e respiram à superfície da água por um par de trompetas respiratórias presentes no cefalotórax. Nesta fase, ocorre uma metamorfose que dará origem ao mosquito adulto.

O adulto, ao emergir da pupa, repousa perto do criadouro larvar até estar pronto para a cópula, o que geralmente ocorre passados um ou dois dias após a emergência. Os machos formam enxames destinados a atrair as fêmeas. Estas acasalam, em regra, apenas uma vez na vida e acumulam o esperma numa estrutura chamada spermateca. A fêmea necessita de efectuar uma refeição sanguínea para que possa ocorrer a maturação dos ovos. Este período de tempo, entre a refeição sanguínea e a maturação dos ovos, é conhecido como ciclo gonotrófico. Os machos alimentam-se exclusivamente de néctares vegetais.

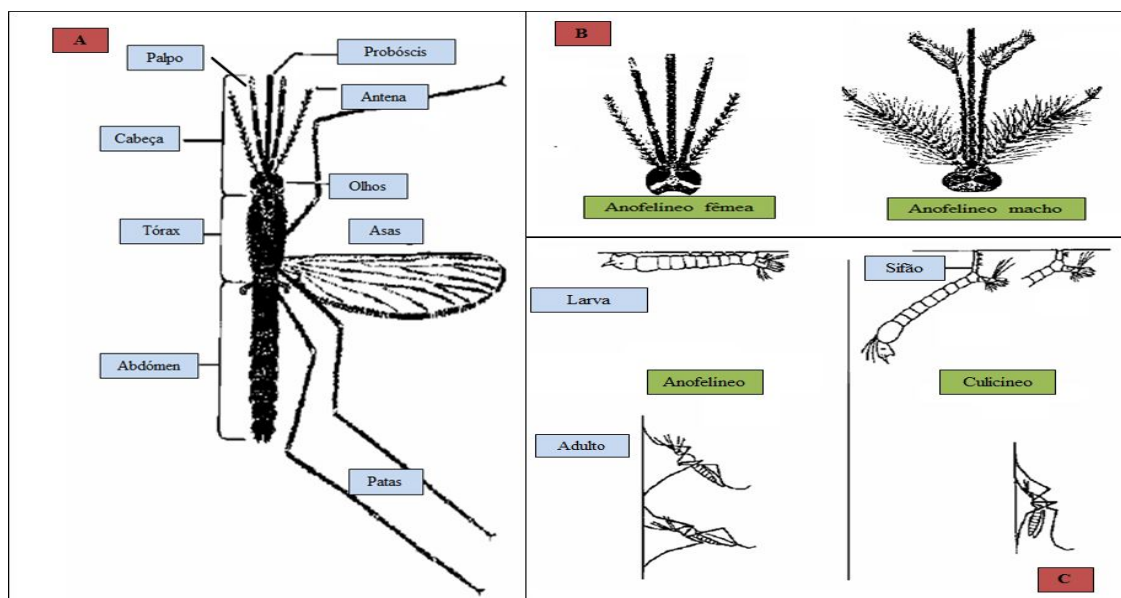


Figura 1.3 – **A.** Morfologia externa de um anofelíneo fêmea adulto. **B.** Cabeça de fêmea e de macho de anofelíneo e respectivo dimorfismo sexual nas antenas e na extremidade dos palpos. Destaca-se ainda o comprimento destes: longos nos dois sexos. **C.** Diferenças no posicionamento de larvas e de adultos de anofelíneos relativamente a culicíneos. Nas larvas de culicíneos destaca-se a presença de um sifão, ausente nas larvas anofelíneas (adaptado de WHO, 2003).

O mosquito adulto possui o corpo dividido em cabeça, tórax e abdómen (Figura 1.3A). Tanto as fêmeas como os machos deste género, ao contrário do que acontece na subfamília Culicinae, possuem os palpos longos, aproximadamente do mesmo comprimento do probóscis. Nos machos, os palpos são dilatados na extremidade e as antenas são plumosas, ao contrário das fêmeas, cujas antenas são pilosas (Figura 1.3B). Os Anofelíneos adultos podem também ser identificados pela sua posição quando em repouso: o abdómen adopta uma posição oblíqua relativamente à superfície (Figura 1.3C).

1.1.2.3 – Comportamento

Os hábitos de picada de um mosquito são um factor extremamente importante na definição do seu papel como vector. Estes hábitos variam entre espécies. É por isso necessário classificar os hábitos de picada de uma população consoante o tipo de hospedeiro no qual se alimentam e o local onde efectuem a refeição sanguínea. Espécies que tenha preferência por um hospedeiro humano são denominadas de antropofílicas e outras que se alimentem preferencialmente em outros animais são denominadas de zoofílicas. As que procuram o interior de habitações humanas para se alimentarem são denominadas de endofágicas, e as que o fazem preferencialmente no exterior definem-se como exofágicas. Também o horário de picada é um factor importante, sendo que a maioria dos anofelíneos se alimenta durante a noite.

Após a refeição sanguínea, as fêmeas procuram um local adequado para repousar enquanto ocorre o desenvolvimento gonotrófico. Este comportamento também é bastante importante, principalmente ao nível do controlo de vectores. Espécies que repousam no interior de habitações humanas são definidas como endofílicas e as que repousam no exterior como exofílicas (Service, 1993). Actualmente, as principais estratégias de controlo de mosquitos incluem o uso de redes mosquiteiras ou a aplicação de insecticidas residuais no interior das habitações (WHO, 2012). Estas medidas de controlo serão tanto mais efectivas quanto mais for o grau de endofagia e endofilia da população vectora (The malERA Consultative Group on Vector Control, 2011).

A escolha do criadouro larvar é também importante, sendo influenciada por uma série de factores, como a temperatura da água, a exposição solar, o nível de oxigenação,

o pH, a salinidade, a quantidade de matéria orgânica e a presença de alimento ou de predadores.

1.2 – O complexo *Anopheles gambiae*

Várias espécies de mosquitos são morfologicamente indistinguíveis entre si. No entanto, estas espécies são isoladas reprodutivamente e, apesar de ser possível a ocorrência de hibridação entre as mesmas, a descendência é geralmente estéril. Estes grupos de espécies morfologicamente idênticas são conhecidos como complexos de espécies gémeas (Service, 1993; della Torre *et al.*, 1997).

Um dos complexos de espécies de mosquitos é o complexo *Anopheles gambiae*, que inclui os principais vectores de malária na África Subsaariana. Este complexo é composto por sete espécies (Coetzee *et al.*, 2000): *Anopheles gambiae sensu stricto* (s.s.) Gilles, 1902; *Anopheles merus* Dönitz, 1902; *Anopheles melas* Theobald, 1903; *Anopheles arabiensis* Patton, 1905; *Anopheles bwambae* White, 1985; *Anopheles quadriannulatus* Theobald, 1911 e *Anopheles quadriannulatus* espécie B (Hunt *et al.*, 1998).

1.2.1 – Identificação

Devido à impossibilidade de distinguir morfologicamente as espécies dentro deste complexo, diversas metodologias de identificação foram sendo desenvolvidas ao longo dos anos: análise citogenética, electroforese isoenzimática, testes de tolerância à salinidade e análises de DNA (Coetzee *et al.*, 2000). As análises citogenética e de DNA acabaram por se tornar as mais utilizadas na identificação das espécies deste complexo.

A análise citogenética baseia-se na existência (e consequente visualização por microscopia óptica) de inversões paracêntricas nos cromossomas politénicos (Coluzzi *et al.*, 1979, 1985), com certas inversões no cromossoma-X a apresentarem-se fixas em determinadas espécies. A formação destes cromossomas dá-se através de um processo de endomitose, no qual ocorre a replicação cromossómica sem que ocorra divisão nuclear. Possuem uma estrutura na qual são visíveis bandas, que correspondem a diferentes níveis de condensação de eucromatina e de heterocromatina (Black IV & Lanzaro, 2001). Estes cromossomas ocorrem apenas nas glândulas salivares de larvas do estado L4 e nas células nutritivas dos ovários de fêmeas semi-grávidas. Assim, este

método não pode ser aplicado em todos os estados do desenvolvimento do mosquito e, nos adultos, apenas ao sexo feminino.

As limitações da análise citogenética não se aplicam às técnicas baseadas na análise de DNA. Além de estar disponível em qualquer tecido biológico, pode ser obtido de amostras armazenadas por uma série de diferentes métodos, é facilmente conservado e transportado e possui uma enorme variedade de potenciais marcadores genéticos (Collins & Paskewitz, 1996; Krzywinski & Besansky, 2003). Diversas metodologias foram então desenvolvidas utilizando a técnica de PCR, destacando-se os trabalhos de Scott *et al.* (1993), Townson & Onapa (1994) e Fetteene *et al.* (2002). Posteriormente, outras metodologias envolvendo enzimas de restrição (Fanello *et al.*, 2002) ou a incorporação de *mismatches* intencionais (Wilkins *et al.*, 2006) foram desenvolvidas. Em geral, estas técnicas baseiam-se na detecção de polimorfismos de tamanho específicos de espécie na região do espaçador intergénico (IGS) do DNA ribossomal (rDNA).

1.2.2 – Distribuição geográfica

O complexo *Anopheles gambiae* está representado em praticamente todo o continente africano abaixo da linha do Sahara. *Anopheles gambiae* s.s. e *An. arabiensis*, os principais vectores de malária deste complexo, têm uma distribuição bastante extensa em toda a África subsaariana (Sinka *et al.*, 2012), coexistindo em simpatria em vastas regiões (Figura 1.4). *Anopheles melas* e *An. merus* têm uma distribuição restrita à costa do continente africano, com *An. melas* a ocorrer na costa ocidental e *An. merus* na costa oriental. *Anopheles quadriannulatus* tem uma distribuição confinada a algumas regiões do sudeste africano, da costa da Tanzânia ou do interior da Etiópia (Coetzee *et al.*, 2000), tendo a espécie B sido reportada exclusivamente na região de Jimma, Etiópia (Hunt *et al.*, 1998). *Anopheles bwambae* foi reportado somente numa região termal, na floresta de Semliki, Uganda (White, 1985).

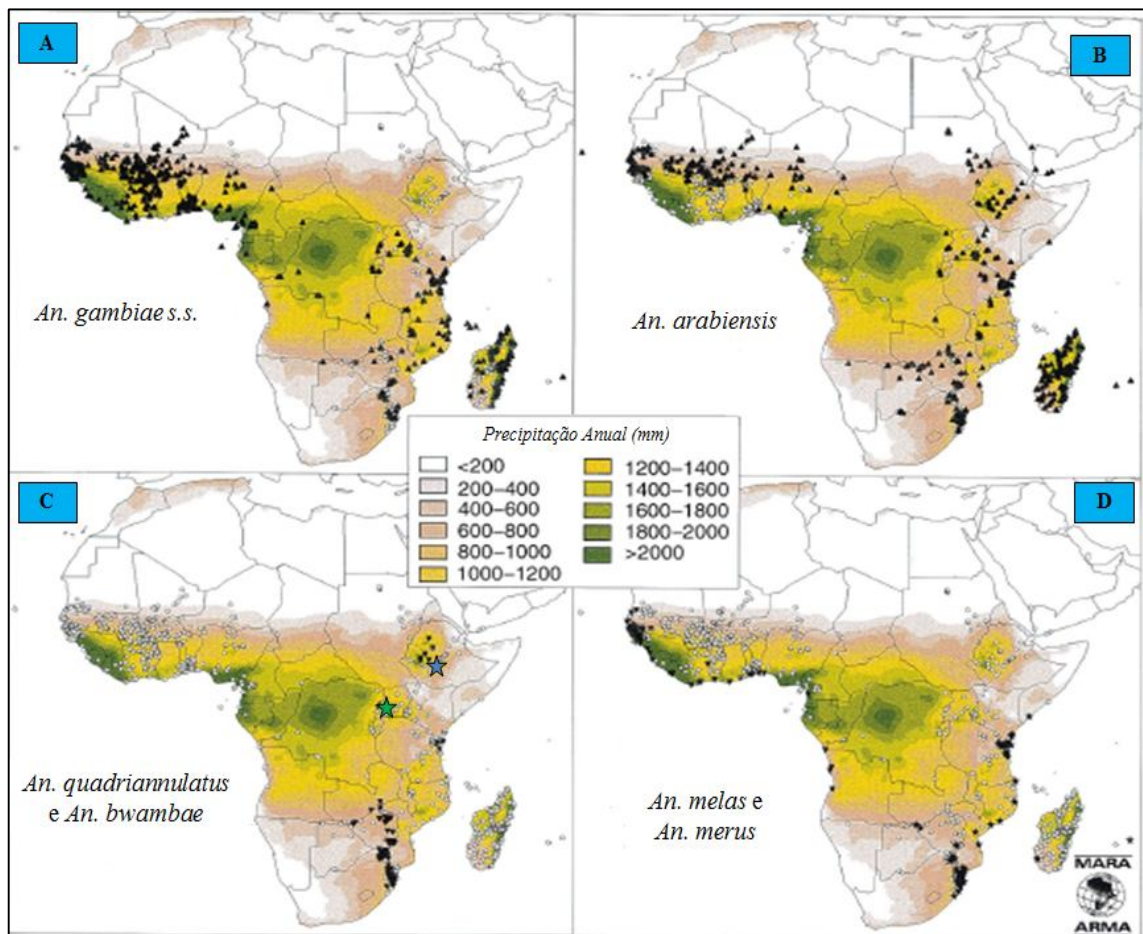


Figura 1.4 – Distribuição geográfica dos membros do complexo *Anopheles gambiae* (adaptado de Coetzee *et al.*, 2000). A localização das espécies está assinalada pelos marcadores pretos, excepto em dois casos no mapa C. **A.** *An. gambiae s.s.*; **B.** *An. arabiensis*; **C.** *An. quadriannulatus*, *An. quadriannulatus* espécie B (estrela azul); *An. bwambiae* (estrela verde). **D.** *An. melas* (costa ocidental) e *An. merus* (costa oriental).

1.2.3 - Bioecologia e comportamento

O complexo *Anopheles gambiae* é muito diversificado a nível bioecológico e comportamental. A seguinte caracterização de cada uma das espécies constituintes do complexo é baseada na revisão de Sinka *et al.* (2010), excepto menção específica.

Anopheles gambiae s.s. – é, juntamente com *An. arabiensis*, um dos principais vectores de malária em África. A sua elevada distribuição geográfica confere-lhe uma plasticidade bastante elevada. É um mosquito intimamente relacionado com a actividade humana e que é geralmente classificado como extremamente antropofílico (Service, 1993; Besansky *et al.*, 2004), endofágico e endofílico. No entanto, fêmeas com comportamento zoofílico e exofílico foram já reportadas (Sousa *et al.*, 2001), demonstrando a possibilidade de existência de populações com comportamentos

extremamente diversos, consoante a disponibilidade de hospedeiros, a localização geográfica e o próprio perfil genético da população.

Os criadouros larvares são também variáveis, desde criadouros temporários, como poças de água feias por pneus de carros ou pegadas, a criadouros permanentes ou semi-permanentes, como arrozais. Mantêm contudo diversas características importantes, sendo colecções de água doce, geralmente com pouca profundidade e com boa exposição solar.

Anopheles gambiae s.s. apresenta uma sazonalidade associada ao período das chuvas, com picos de abundância a surgirem pouco tempo após o começo das mesmas. No entanto, o facto de esta espécie estar também associada a criadouros permanentes como os arrozais, permite-lhe ter, em determinadas regiões, um desenvolvimento ao longo de todo o ano (Caputo *et al.*, 2011).

Anopheles arabiensis – tal com *An. gambiae* s.s., possui uma extensa distribuição geográfica o que lhe confere plasticidade em termos bioecológicos e comportamentais. Geralmente definido como antropofílico, mas mais exofágico e exofílico do que *An. gambiae* s.s., pode, consoante a localização geográfica, variar os seus padrões de picada e de repouso. Está presente em simpatria com *An. gambiae* s.s. em vastas regiões, mas ocupa territórios mais áridos, como savanas ou florestas pouco densas. Os criadouros larvares são semelhantes aos de *An. gambiae* s.s. e também apresenta sazonalidade associada aos períodos de chuva.

Anopheles melas – é uma espécie essencialmente costeira, associada a águas salobras, a sapais do género *Paspalum* e a mangais do género *Avicenna*. Apesar de não ter a importância de *An. gambiae* s.s. e de *An. arabiensis* na transmissão de malária no continente africano, neste tipo de regiões e em densidades muito elevadas, pode constituir um problema de saúde.

É uma espécie oportunista, existindo descrições de populações quer altamente antropofílicas, quer altamente zoofílicas. É geralmente considerada exofílica, mas alimentando-se quer no interior quer no exterior de habitações.

As fêmeas colocam os ovos em terrenos húmidos, ao invés de os colocar directamente na água. Isto é feito na maré-baixa, eclodindo os ovos com a subida da maré. Gelfand (1955) sugeriu que a sazonalidade desta espécie não se prende com a época das chuvas, mas sim com a subida das marés.

Anopheles merus – é, tal como *An. melas*, uma espécie associada a águas salobras. No entanto, não suporta níveis de salinidade tão elevados, nem depende da subida das marés para eclosão dos ovos. É característico de pântanos ou poças de água rasas e salobras, típicos das regiões litorais, mas pode ser encontrado em regiões mais interiores em salinas ou poças de água salgada.

Apresenta um comportamento geralmente exofílico e exofágico, sendo oportunista na escolha do hospedeiro.

Tal como *An. melas*, pode ser um importante vector de malária em regiões costeiras, como em algumas áreas da Tanzânia ou Moçambique.

Anopheles quadriannulatus – também designado por *An. quadriannulatus* espécie A (Hunt *et al.*, 1998), é tal como *An. gambiae s.s* e *An. arabiensis*, um mosquito típico de colecções de água doce mas, sendo marcadamente zoofílico e exofílico (Service, 1993), não é considerado vector de malária humana.

Anopheles quadriannulatus espécie B – descrita por Hunt *et al.* (1998), esta espécie não possui ainda um nome científico, sendo designada por espécie B devido à sua semelhança com *An. quadriannulatus*. A sua designação como nova espécie deve-se ao facto de cruzamentos entre a nova espécie B e exemplares sul-africanos de *An. quadriannulatus* terem resultado na produção de machos estéreis, na desigualdade das frequências dos dois sexos e na ausência de separação entre cromossomas homólogos durante a meiose.

Anopheles bwambae – tem distribuição restrita à floresta de Semliki, Uganda, usando fontes termais de água salobra como biótopo larvar. Nesta região é um importante vector de malária humana, sendo bastante antropofílico (White, 1985).

1.2.4 – Especiação e evolução

Segundo Coluzzi *et al.* (1985), o complexo *Anopheles gambiae* emergiu a partir de um processo de especiação recente. A fundamentar este processo de especiação recente estão as seguintes observações: a distinção morfológica entre os membros do complexo é extremamente difícil; as distâncias genéticas observadas neste complexo são bastante inferiores às verificadas para outros complexos de espécies gémeas; os híbridos apresentam um forte emparelhamento dos cromossomas homólogos, existindo mesmo zonas cromossómicas onde ocorrem sinapses, e as únicas diferenças entre

cromossomas politénicos são os diferentes padrões de bandas, que ocorrem devido às inversões paracêntricas; o isolamento reprodutivo geralmente observado na natureza, não é completo, havendo evidências de introgressão pelo menos entre *Anopheles gambiae s.s* e *An. arabiensis* (della Torre *et al.*, 1997). Coluzzi *et al.* (1985) salienta ainda que a estreita relação que *An. gambiae s.s* e *An. arabiensis* desenvolveram com o ser humano, foi também um factor importante no processo de especiação destas espécies.

Mais recentemente, métodos moleculares foram utilizados para inferir as relações taxonómicas e filogenéticas entre as espécies do complexo *An. gambiae*, em especial *An. gambiae s.s.* e *An. arabiensis*, e também para avaliar a possibilidade de introgressão entre estas. Análises de DNA mitocondrial (mtDNA) e de DNA nuclear demonstraram a existência de introgressão entre estes dois vectores, apontando para um modelo de genoma em mosaico, no qual o fluxo genético entre espécies ocorre, mas apenas em regiões genómicas restritas, possivelmente envolvendo *loci* que não estão associados no processo de especiação (Besansky *et al.*, 1994, 1997, 2003; Krzywinski & Besansky, 2003).

1.2.4.1 – Especiação incipiente em *Anopheles gambiae s.s.*

A história evolutiva do complexo *Anopheles gambiae* não se resume à divergência entre as espécies actualmente reconhecidas neste complexo. *Anopheles gambiae s.s.* passa por um processo de especiação incipiente, com consequências na transmissão de malária. Inversões paracêntricas, mais especificamente no cromossoma 2, estiveram na origem destas evidências. Cinco formas cromossómicas ou citoformas foram descritas (Coluzzi *et al.*, 1985), tendo como base não só estas inversões mas também divergências ecológicas e comportamentais (Krzywinski & Besansky, 2003):

Forest – caracteriza-se pela presença da variante base do cromossoma 2, não possuindo inversões ou possuindo as inversões 2La, 2Rb e/ou 2Rd em frequências muito baixas. Ocupa regiões de floresta húmida ou savanas relativamente húmidas.

Savanna – caracteriza-se por possuir as inversões 2Rb-2La. Em algumas regiões geográficas pode ainda apresentar os arranjos cromossómicos 2Rcu e 2Rbcu, ou o polimorfismo 2Rb/bcd. Esta citoforma encontra-se distribuída por todo o continente africano, sendo a única presente na África Oriental (Coluzzi *et al.*, 1985).

Bissau – caracteriza-se pela presença da inversão 2Rd, estando presente em arrozais da região costeira da Gâmbia, do Senegal, da Guiné-Bissau e da Guiné-Conacri.

Mopti – caracteriza-se por possuir o polimorfismo 2Rbc/u. É característica de regiões irrigadas, se bem que também utiliza criadouros larvares em locais mais secos, durante a estação seca. Foi identificada no sul do Mali, no norte da Guiné-Conacri, no norte da Costa do Marfim e no Burkina Faso.

Bamako – caracteriza-se pela presença da inversão j em associação com as inversões cu e bcu. Foi identificada no sul do Mali e no norte da Guiné-Conacri. Petrarca *et al.* (1983) observou a associação da inversão j com as inversões d ou bd na Guiné-Bissau.

Mais recentemente, foram descritas duas formas moleculares, denominadas formas M e S, baseadas em diferenças nucleotídicas presentes nas regiões do espaçador interno transcrito (ITS) (Gentile *et al.*, 2001) e do IGS (della Torre *et al.*, 2001) do rDNA. Trabalhos como os de Fanello *et al.* (2002) e Wilkins *et al.* (2006), citados anteriormente como métodos capazes de diferenciar entre membros do complexo *An. gambiae*, foram desenvolvidos de modo a permitirem também a identificação destas formas moleculares. Outros marcadores, como o retrotransposão SINE200X6.1, foram também referenciados como capazes de diferenciar as formas moleculares (Santolamazza *et al.*, 2008).

A forma S está presente em toda a região subsaariana, enquanto a forma M se encontra restrita à costa ocidental do continente. Aqui, a forma M está geralmente associada a regiões mais áridas, enquanto a forma S é característica de regiões mais húmidas. Não obstante, as duas formas coabitam em simpatria em extensas áreas da África Ocidental, mas híbridos entre as duas formas são em regra raros, na ordem de 1% ou inferior (della Torre *et al.*, 2005). Uma exceção parece ser o extremo ocidental de África, onde foram reportadas elevadas frequências de hibridação, nomeadamente na Guiné-Bissau e na Gâmbia (Oliveira *et al.*, 2008; Caputo *et al.*, 2008, 2011), indicando a presença de barreiras incompletas ao fluxo genético entre formas moleculares.

Analisando formas M e S provenientes dos Camarões e do Mali, Turner *et al.* (2005) identificaram duas regiões adjacentes aos centrómeros dos cromossomas 2L e X, a que chamaram de “ilhas de especiação”. Os autores observaram uma diferenciação

significativa entre formas moleculares nestas duas regiões do genoma, em contraste com uma baixa diferenciação observada no restante genoma. Propuseram assim que a homogeneidade da maioria do genoma de *An. gambiae* s.s. é consequência da existência de elevado fluxo genético entre as duas formas moleculares e que as “ilhas de especiação” contêm os genes responsáveis pelo isolamento reprodutivo das duas formas. Posteriormente, White *et al.* (2010) identificaram uma terceira região de elevada diversidade entre formas M e S no Mali, adjacente à região centromérica do cromossoma 3L. Os autores sugeriram ainda que, inversamente ao que era proposto por Turner *et al.* (2005), o fluxo genético entre as duas formas moleculares era reduzido, como consequência do baixo *fitness* de híbridos entre M e S, sendo estas três “ilhas de especiação” um produto do processo de especiação, ao invés de serem uma causa desse mesmo processo.

Uma coincidência entre formas cromossômicas e moleculares nem sempre se verifica, variando consoante a localização geográfica e as características ecológicas locais (della Torre *et al.*, 2002). A forma molecular S corresponde às citoformas *Bamako*, *Savanna* e *Forest*, enquanto a forma molecular M corresponde às citoformas *Mopti*, *Bissau*, *Savanna* e *Forest* (della Torre *et al.*, 2001). Suspeita-se que as citoformas não estão envolvidas em mecanismos de isolamento reprodutivo, mas sim em adaptações a diferentes características bioecológicas, o que pode explicar esta discrepância entre formas cromossômicas e moleculares (Krzywinski & Besansky, 2003).

Para perceber que mecanismos estão envolvidos neste processo de especiação, diversos estudos têm vindo a ser realizados, procurando não só factores ecológicos que permitam explicar este fenómeno, mas também diferenças fenotípicas entre formas que possam ter implicações nos programas de controlo vectorial. Lehmann & Diabaté (2008) publicaram uma revisão sobre estes estudos, focando aspectos como a distribuição geográfica, resistência a insecticidas, adaptação a criadouros larvares e comportamentos associados ao acasalamento.

A forma M está mais associada a criadouros permanentes associados à actividade humana, tais como arrozais, e onde a pressão exercida por parte de predadores é superior. Por outro lado, forma S predomina em criadouros temporários, dependentes das águas das chuvas e com menor pressão de predadores (Diabaté *et al.*,

2008). Deste modo, pode explicar-se a maior capacidade de desenvolvimento da forma M em regiões mais áridas, o que lhe confere ainda a possibilidade de se desenvolver ao longo de todo o ano (contrariamente à forma S, que possui um pico de abundância na estação das chuvas), com consequências nos padrões de transmissão de malária. Estas evidências levaram Diabaté *et al.* (2008) a sugerir que a pressão exercida por predadores nos estádios larvares seria um dos mecanismos responsáveis pela divergência ecológica entre as formas moleculares.

Mecanismos de isolamento reprodutivo ligados ao processo de acasalamento foram também estudados. No Burkina Faso e no Mali, Diabaté *et al.* (2006, 2009) demonstraram não só uma frequência de enxames de machos mistos inferior à esperada, mas também a importância de determinados marcadores no terreno na formação de enxames. A forma S procura locais de terra batida enquanto na forma M é importante a existência de um contraste de cores claras e escuras no terreno. Apesar destes dados, os mecanismos que conduziram a este processo de especiação incipiente continuam por esclarecer.

1.2.5 – O complexo *Anopheles gambiae* na Guiné-Bissau

Na Guiné-Bissau, o complexo *Anopheles gambiae* está representado pelas espécies *An. gambiae s.s.*, *An. arabiensis* e *An. melas* (Petrarca *et al.*, 1983; Jaenson *et al.*, 1994; Fonseca *et al.*, 1996; Palsson *et al.*, 1998, 2004; Dabiré *et al.*, 2008). Enquanto *An. melas* se encontra em regiões mais costeiras, atingindo elevadas frequências em determinadas localidades, *An. arabiensis* está presente em regiões do interior, em frequências muito inferiores (0,9%-11,5%) (Pinto *et al.*, comunicação pessoal; Petrarca *et al.*, 1983). *Anopheles gambiae s.s.* distribui-se por todo o país, com a forma S a ser predominante nas zonas costeiras (onde a frequência de híbridos é também elevada) e na zona leste. A forma M predomina nas regiões norte e centro da Guiné-Bissau (Pinto *et al.*, comunicação pessoal).

Atentando especificamente na região de Antula, colheitas efectuadas entre 1993 e 2007 revelaram uma predominância da forma S, com níveis de hibridação elevados e constantes ao longo dos anos (Pinto *et al.*, comunicação pessoal; Oliveira *et al.*, 2008). Exemplares de *An. melas* foram também identificados, mas em baixas frequências (2,3%-5,5%) (Pinto *et al.*, comunicação pessoal; Palsson *et al.*, 2004).

Tal como referido anteriormente, na Guiné-Bissau observa-se um elevado nível de hibridação entre formas moleculares M e S de *Anopheles gambiae* s.s., tendo este fenómeno sido observado essencialmente na região costeira (Oliveira *et al.*, 2008; Marsden *et al.*, 2011).

A existência de elevados níveis de hibridação nesta região, oferece a oportunidade de tentar perceber de que modo é mantida a divergência genética entre as duas formas (Marsden *et al.*, 2011): se através de um modelo em que existe fluxo genético, exceptuando nas “ilhas de especiação” (Turner *et al.*, 2005); ou através de um modelo de especiação sem fluxo genético (White *et al.*, 2010). Oliveira *et al.* (2008), através da análise de diferenciação genética entre microssatélites, reforçaram a teoria explanada por Turner *et al.* (2005), de que o fluxo genético entre formas moleculares ocorre somente em algumas regiões do genoma, com as regiões centroméricas dos cromossomas a manterem elevados níveis de divergência. A presença de híbridos M/S em elevada frequência no extremo ocidental de África, conduziu à sugestão da ocorrência de diferentes níveis de fluxo genético em diferentes regiões geográficas ou em diferentes estações (Oliveira *et al.*, 2008), com níveis superiores de fluxo genético a verificarem-se neste extremo do continente africano (Caputo *et al.*, 2008). Deste modo, Marsden *et al.* (2011) propuseram um modelo de “mosaico geográfico de isolamento reprodutivo”, no qual os mecanismos e os níveis de isolamento reprodutivo variam entre diferentes áreas geográficas onde as formas M e S ocorrem em simpatria. Este modelo assume então a existência de um mecanismo de isolamento genético com fluxo genético, tal como proposto por Turner *et al.* (2005). Marsden *et al.* (2011) verificaram não existir um menor *fitness* de híbridos M/S e demonstraram também a existência de introgressão assimétrica entre M e S, o que contribui para a manutenção da divergência entre ambas as formas, apesar do fluxo genético entre as duas promover a homogeneização do restante genoma.

1.3 – O sistema imunitário do mosquito

1.3.1 – Considerações gerais

O sistema imune dos mosquitos caracteriza-se pela existência de três principais mecanismos de defesa: fagocitose, lise e melanização, que actuam em três principais tecidos: o hemocélio, o estômago e as glândulas salivares (Figura 1.5) (Hillyer, 2010).

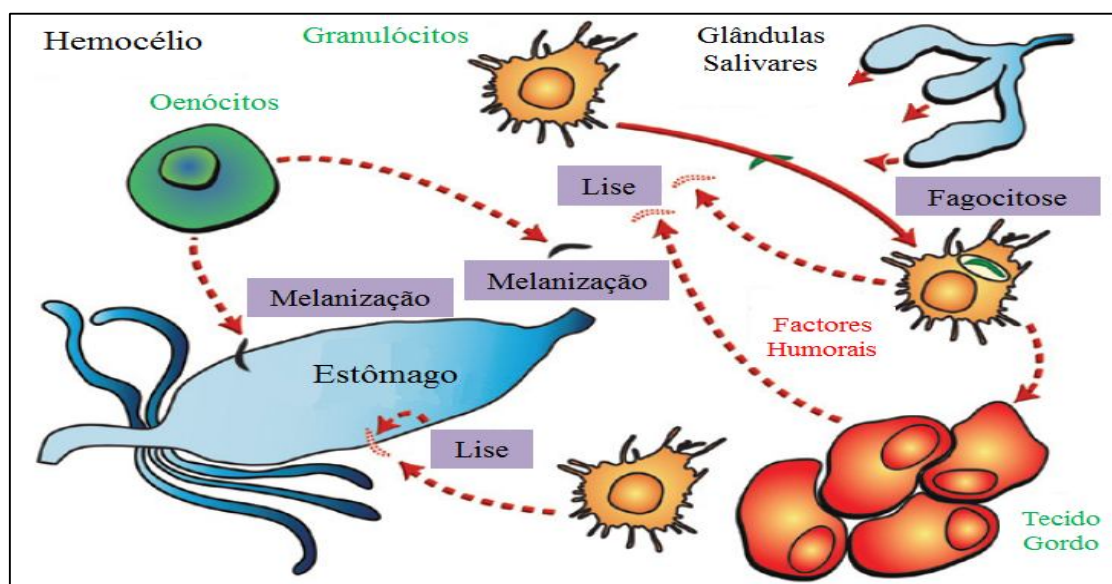


Figura 1.5 – Esquema do sistema imunitário do mosquito (adaptado de Hillyer, 2010). Três mecanismos de defesa (lise, melanização e fagocitose) são os principais responsáveis pela eliminação de agentes patogênicos nos tecidos do mosquito (hemocélio, estômago e glândulas salivares).

O reconhecimento inicial dos agentes patogênicos é feito através de receptores específicos, que podem ser componentes celulares ou humorais. Existe uma grande interação entre estes diferentes componentes, pelo que, numa resposta imunitária, vários mecanismos de eliminação podem ser activados. O tecido gordo activa somente a via humoral, libertando um conjunto de péptidos antimicrobianos que promovem a lise celular. Já as células do hemocélio (granulócitos e oenócitos) promovem tanto uma resposta celular como humoral, libertando péptidos responsáveis pela melanização, promovendo a formação de radicais livres de oxigénio que provocam dano oxidativo, ou efectuando fagocitose. O papel dos três tecidos no sistema imune do mosquito é sumariado em seguida, tendo como base Hillyer (2010).

O estômago é o destino dos microorganismos que são ingeridos através da refeição sanguínea. Aqui, vários péptidos com efeito antimicrobiano são rapidamente produzidos em resposta a uma infecção, desencadeando processos de lise e de melanização. É também estimulada a produção de moléculas noutros tecidos, que são posteriormente transportadas até ao estômago.

No hemocélio (cavidade que contem os órgãos do mosquito), dois tipos de células são responsáveis pela resposta imunitária: as células dos tecidos gordos e os hemócitos (granulócitos e oenócitos). Enquanto os granulócitos são responsáveis por

fenómenos de fagocitose e pela produção de compostos humorais que desencadeiam processos de lise celular, os oenócitos promovem o processo de melanização.

Pouco se sabe sobre o papel das glândulas salivares na resposta imunitária. No entanto, diversos estudos revelaram a produção de péptidos do sistema imunológico nestes tecidos.

1.3.2 – A proteína TEP1

A proteína TEP1 pertence a uma família de proteínas, designadas TEP (*thioester-containing protein*), que está presente em muitos organismos e que se caracteriza pela presença de um motivo tioéster conservado. Nos vertebrados, esta família inclui as α_2 -macroglobinas e os factores C3/C4/C5 do sistema complemento, envolvidos em processos de imunidade inata. Nos mosquitos, a família TEP inclui glicoproteínas segregadas pelos hemócitos na hemolinfa, clivadas após uma lesão tecidular e que, através do motivo tioéster, se ligam à superfície de vários agentes patogénicos como bactérias Gram-negativas ou parasitas do género *Plasmodium*, promovendo a sua eliminação através de processos de fagocitose, lise e melanização (Levashina *et al.*, 2001; Chirstophides *et al.*, 2002; Blandin *et al.*, 2004).

Sabendo da importância destas proteínas no sistema imune do mosquito, e em especial da proteína TEP1, Blandin *et al.* (2004) propuseram que esta proteína é um factor importante na definição da competência vectorial de *Anopheles gambiae* s.s. Os autores demonstraram, não só que a eliminação de parasitas do género *Plasmodium* é mediada pela ligação de TEP1 a oocistos presentes no estômago do mosquito, mas também que o silenciamento do gene TEP1 provoca a transformação de uma estirpe refractária numa estirpe susceptível, em mosquitos *An. gambiae* s.s. infectados com o parasita de roedores *Plasmodium berghei* Vincke & Lips, 1948. Descreveram ainda a existência de diferentes alelos para o gene TEP1, associados à susceptibilidade (TEP1s) ou à resistência (TEP1r) à infecção.

Posteriormente, Obbard *et al.* (2008) estudaram a variabilidade genética destes alelos em *An. gambiae*, comprovando a existência de um elevado grau de polimorfismo entre os mesmos. Sugeriram ainda que esta variabilidade era produto de conversão génica entre o gene TEP1 e outros genes desta família, tendo os alelos susceptíveis e

resistentes surgido em diferentes pontos temporais (sendo TEP1r mais recente que TEP1s).

Blandin *et al.* (2009) confirmaram a relação entre a proteína TEP1 e a susceptibilidade ao *Plasmodium*. Utilizando estirpes laboratoriais de *An. gambiae* com níveis de susceptibilidade conhecidos, renomearam os alelos susceptíveis e resistentes: TEP1s passou a ser designado de TEP1*S1 e TEP1r de TEP1*R1. Descreveram também 3 novos alelos, com base na semelhança com os dois anteriormente descritos: dois alelos associados à susceptibilidade (TEP1*S2 e TEP1*S3) e um associado à resistência (TEP1*R2). Demonstraram ainda que o alelo R1 conferia elevada resistência ao *Plasmodium* e que o alelo S2 elevada susceptibilidade, com o alelo R2 a apresentar um fenótipo intermédio.

Tendo em conta estas observações e lembrando que *An. gambiae* s.s. está em processo de especiação incipiente, White *et al.* (2011) colocaram a hipótese de o gene TEP1 estar relacionado com este processo. Analisando sequências TEP1 de mosquitos da forma M e S provenientes de cinco países da África Ocidental, verificaram a existência de dois grupos de alelos: susceptíveis (TEP1s) e resistentes (TEP1r), estando os últimos divididos em dois subgrupos, TEP1^A (correspondente ao alelo *R2) e TEP1^B (correspondente ao alelo *R1). Mais, observaram que tanto TEP1s como TEP1^A estão presentes nas duas formas moleculares, enquanto TEP1^B parece ser exclusivo da forma M. Considerando o papel que este gene tem na resposta a diversos agentes patogénicos, em especial a parasitas do género *Plasmodium*, os autores sugerem que a associação do alelo resistente TEP1^B (ou *R1) à forma M surgiu como consequência da pressão exercida por agentes patogénicos e que esta pressão, exercida na fase larvar, pode ser uma força selectiva mais forte que eventuais desafios colocados ao sistema imunitário do mosquito adulto. Os autores sugerem também que a elevada frequência do alelo TEP1^B na forma M é consequência da maior vantagem que o alelo confere a esta forma molecular nos criadouros permanentes, onde a forma M é predominante sobre a forma S, e onde a pressão exercida por agentes patogénicos é superior à verificada nos criadouros temporários. Os autores referem ainda que o reduzido fluxo genético entre formas moleculares de *An. gambiae* s.s. pode justificar a ausência do alelo TEP1^B na forma S, mas que a menor pressão exercida sobre esta forma nos criadouros temporários pode também explicar essa ausência.

1.4 – Objectivos

O presente trabalho teve como objectivos:

- Avaliar a composição específica e a distribuição das formas moleculares M e S de *Anopheles gambiae* s.s. em criadouros temporários e permanentes numa região de intensa hibridação entre formas (Guiné-Bissau);
- Determinar a diversidade molecular do gene TEP1 nas formas M e S e nos diferentes tipos de criadouros larvares;
- Comparar os padrões de variação genética do gene TEP1 entre formas moleculares e entre diferentes biótopos larvares.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 – República da Guiné-Bissau

A República da Guiné-Bissau localiza-se na costa Ocidental de África, possuindo uma área de 36 125 km² e tendo como capital a cidade de Bissau. Tem como fronteiras terrestres o Senegal, a Norte e a Guiné Conacri, a Este e Sudeste e como fronteira marítima o Oceano Atlântico, a Sul e Oeste. Possui ainda diversos territórios insulares, que formam o Arquipélago de Bijagós (Figura 2.1) (Presidência da República da Guiné-Bissau, 2012).



Figura 2.1 – Localização geográfica da República da Guiné-Bissau no continente africano e mapa do país (adaptado de CIA, 2012).

A sua região continental é formada por uma planície costeira semi-pantanosa e por diversos estuários e rios que penetram o interior do país. No interior, a paisagem caracteriza-se pela existência de planaltos pouco elevados, com uma altitude máxima de 300m acima do nível médio do mar, e pela existência de uma área de savana na zona leste do país (Presidência da República da Guiné-Bissau, 2012; CIA, 2012).

A Guiné-Bissau possui um clima tropical quente e húmido, caracterizado pela existência de duas estações: a estação das chuvas, que se estende desde Junho até Novembro, e cujos meses de maior pluviosidade são Julho e Agosto, e a estação seca, que engloba os restantes meses do ano. Nesta estação, os meses de Dezembro e Janeiro são por norma os mais frescos (Presidência da República da Guiné-Bissau, 2012).

2.2 – Material biológico: captura e conservação

O material biológico utilizado na realização deste trabalho, consistindo em formas larvares e adultas de culicídeos, foi amostrado em Antula (11° 50'N, 15° 30'W), um bairro da capital, Bissau, situado a cerca de 5 km a Norte do centro da cidade (Figura 2.2). Antula é um bairro periférico semi-rural delimitado por dois arrozais, um na zona Este e o outro na zona Oeste. A maioria das habitações desta localidade é construída em argila com telhados de palha, zinco ou fibrocimento (Lusalite). A presença de animais domésticos é comum no interior destas mesmas habitações (Oliveira *et al.*, 2008; Palsson *et al.*, 2004).

A colheita de mosquitos foi feita por uma equipa composta por investigadores e técnicos do Instituto Nacional de Saúde (INASA, Guiné-Bissau), do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT, Portugal) e da Universidade de Roma “La Sapienza” (Itália).



Figura 2.2 – Localização geográfica de Antula, local de captura dos culicídeos utilizados neste estudo, e do centro da cidade de Bissau (adaptado de GoogleTM Earth).

As formas larvares foram prospectadas em dois tipos de criadouros: temporários e permanentes. No caso dos criadouros temporários, a prospecção foi feita em dois charcos e algumas pequenas poças, localizados ao longo de uma estrada, a cerca de 10m-20m de habitações humanas (Figura 2.3). Estes corpos de água resultaram de depressões na estrada de terra batida (no caso dos dois charcos) ou de marcas de pneus e pegadas (no caso das poças), preenchidos com água das chuvas (Figura 2.3). Estas capturas decorreram nos dias 1, 4, 9 e 25 de Outubro de 2010. No caso do criadouro permanente, os exemplares foram capturados num arrozal localizado a *ca.* 30m-40m das

habitações humanas, nos dias 9 e 25 de Outubro de 2010 (Figura 2.3). A prospecção de ambos os tipos de criadouros foi efectuada com recurso a caços e pipetas, por uma equipa de 4 colectores, com um esforço de captura de *ca.* 60 minutos por colector.

Os imaturos capturados foram separados e conservados individualmente na forma larvar em microtubos de 1,5ml com etanol 80%, etiquetados com o local e a data da captura. Do material biológico colhido, uma subamostra de 16 exemplares *An. gambiae s.l.* foram criados até à fase adulta, para utilização em testes de sensibilidade a insecticidas, tendo sido morfologicamente identificados com recurso à chave de Hervy *et al.* (1998). Estes foram conservados individualmente em microtubos de 0,5ml contendo cristais de sílica gel e algodão. Todos os exemplares foram transportados para o IHMT, onde foram conservados no escuro, à temperatura de 10°C.

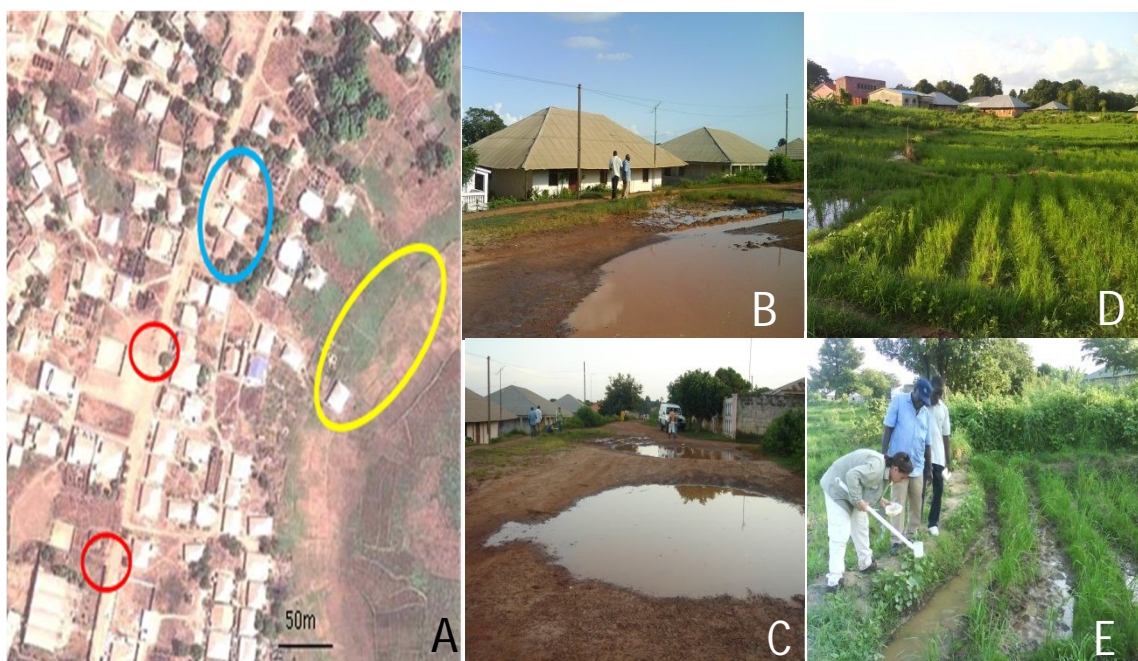


Figura 2.3 – **A.** Localização dos locais de captura de culicídeos em Antula, Guiné-Bissau. As ovas vermelhas correspondem aos criadouros temporários, a oval amarela corresponde ao criadouro permanente (arrozal) e a oval azul corresponde às habitações onde foram feitas as capturas dos indivíduos adultos (adaptado de GoogleTM Earth). **B.** Criadouros temporários (charco e poças de água) e tipo de casas onde foram colhidos adultos. **C.** Criadouros temporários (dois charcos). **D e E.** Criadouro permanente (arrozal).

Mosquitos adultos foram colhidos no interior de três habitações humanas, utilizando armadilhas luminosas do tipo CDC, entre as 17h30m do dia 12 de Outubro de 2010 e as 9h30m do dia 13 de Outubro de 2010 (Figura 2.3). As armadilhas foram

colocadas no interior do quarto de dormir e perto da cama, *ca.* 1,5m do nível do solo. Após a captura, os indivíduos foram morfologicamente identificados através das chaves de Gillies & Meillon (1968), Gillies & Coetzee (1987) e Hervy *et al.* (1998) e conservados individualmente em tubos contendo cristais de sílica gel e algodão, tendo sido transportados para o IHMT e conservados no escuro, à temperatura de 10°C.

Foram ainda feitas colheitas de adultos em repouso no interior de casas recorrendo a aspiração manual ou a colheitas com lençol e piretrina. As colheitas realizaram-se entre os dias 10 e 15 de Outubro 2010, entre as 15h00m e as 17h00m, tendo-se amostrado um total de 30 casas, das quais 5 foram positivas para *An. gambiae s.l.*. Estes indivíduos foram conservados individualmente em tubos contendo cristais de sílica gel e algodão, tendo sido transportados para a Universidade de Roma “La Sapienza”, onde foram mantidos à temperatura ambiente até a extracção de DNA.

2.3 – Extracção, quantificação e pureza do DNA genómico

A extracção de DNA foi realizada com o kit de extracção de DNA DNeasy® Blood & Tissue Kit (Quiagen). Este processo foi realizado individualmente para cada mosquito, tendo sido utilizada a totalidade da biomassa de cada exemplar. Inicialmente foi evaporado o etanol no qual estavam conservadas as larvas, por incubação durante a noite numa estufa a 37°C. As larvas e mosquitos adultos foram homogeneizados com setas plásticas no tampão de lise to kit, tendo-se de seguida executado os passos descritos no protocolo do fabricante. A eluição final do DNA foi feita com 50µl de tampão AE (Quiagen) para larvas L1, 100µl para larvas L2, L3 e L4 e 200µl do mesmo tampão para adultos. Em cada processo de extracção foi usado um branco, sem tecidos de mosquito e, na extracção de algumas larvas capturadas no criadouro permanente, foi também usado um controlo positivo (larva de *Anopheles gambiae s.s.* de colónia). Foram preparadas alíquotas de 10µl para utilização em análises moleculares, que foram armazenadas a 4°C. As amostras de DNA stock foram conservadas a -20°C.

Posteriormente, foi efectuada uma quantificação do DNA presente em cada amostra, bem como uma análise da pureza do mesmo. Esta análise foi efectuada por espectrofotometria num sistema Nanodrop® 1000 (ThermoScientific). O parâmetro pureza foi avaliado através do quociente entre os valores de absorvância a 260nm e 280nm.

2.4 – Análises moleculares

2.4.1 – Identificação de espécies e formas moleculares do complexo *Anopheles gambiae*

A identificação de espécies e formas moleculares do complexo *Anopheles gambiae* foi realizada por uma técnica de PCR-RFLP, descrita por Fanello *et al.* (2002). Para a identificação das espécies utiliza-se um *primer forward* universal (UN), que é comum a todas as espécies do complexo, e um *primer reverse* específico para cada uma dessas espécies: *An. gambiae* s.s. (GA), *An. arabiensis* (AR), *An. melas* (ML), e *An. quadriannulatus* (QD). Estes *primers* permitem a amplificação de fragmentos de diferentes tamanhos, específicos de cada espécie, na região IGS do rDNA. Seguidamente, os produtos amplificados são sujeitos a uma restrição enzimática com a enzima *Hha* I, permitindo a identificação das formas moleculares M e S de *An. gambiae* s.s., tal como de híbridos entre as duas formas (Figura 2.4).

A mistura de reacção, de volume total 10µl, foi composta por 1µl de DNA *template* (diluição de 1:10 a partir do stock); Tampão *Green GoTaq®* (Promega) a 1X; 2,5mM de MgCl₂ (Promega); 0,2mM de cada dNTP (Promega); 0,5ng/µl de *primer* UN [5'–GTG TGC CCC TTC CTC GAT GT–3']; 0,25ng/µl de *primer* GA [5'–CTG GTT TGG TCG GCA CGT TT–3']; 0,75ng/µl de *primer* AR [5'–AAG TGT CCT TCT CCA TCC TA–3']; 0,5n/µl de *primer* ML [5'–TGA CCA ACC CAC TCC CTT GA–3'] e 0,05U de *Go Taq®* DNA Polimerase (Promega) (Scott *et al.*, 1993; Fanello *et al.* 2002). A reacção de PCR realizou-se em 30 ciclos, cada um composto por 30 segundos de desnaturação a 94°C, 30 segundos de *annealing* a 50°C e 30 segundos de extensão a 72°C. Seguiu-se um período de extensão final a 72°C por 10 minutos. Após esta reacção, o produto amplificado foi sujeito a digestão enzimática a 37°C durante 4 horas, sendo que cada mistura de reacção, de 20µl de volume total, foi composta por 10µl de produto amplificado; Tampão C (Promega) a 1X; 0,1mg/ml de BSA (Promega) e 2U de *Hha* I (Promega).

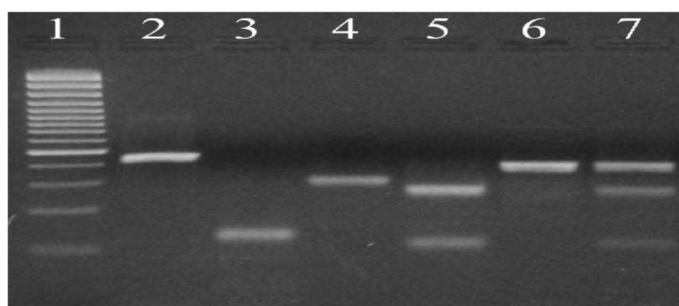


Figura 2.4 – Identificação de espécies e formas moleculares do complexo *An. gambiae*, por PCR-RFLP. Poço 1 – marcador de peso molecular de 1kb; poço 2 – *An. melas*; poço 3 – *An. quadriannulatus*; poço 4 – *An. arabiensis*; poço 5 – *An. gambiae* s.s. forma S; poço 6 – *An. gambiae* s.s. forma M; poço 7 – *An. gambiae* s.s. híbrido M/S (adaptado de Fanello *et al.*, 2002).

Para confirmação da identificação das formas moleculares M e S de *An. gambiae* s.s. procedeu-se à amplificação por PCR de inserções do retrotransposão SINE200X6.1 no cromossoma X. Este retrotransposão apresenta-se fixo na forma M e ausente na forma S, o que permite a obtenção de um padrão de bandas de PCR distinto para cada forma (Figura 2.5), de acordo com o protocolo descrito por Santolamazza *et al.* (2008).

A mistura de reacção, com volume total de 25µl, foi composta por 1µl de DNA *template*; Tampão *Green GoTaq®* (Promega) a 1X; 5mM de MgCl₂ (Promega); 0,32mM de cada dNTP (Promega); 0,072µM do *primer* S200f [5'-TCG CCT TAG ACC TTG CGT TA-3']; 0,072µM do *primer* S200r [5'-CGC TTC AAG AAT TCG AGA TAC-3']; e 0,04U de *Go Taq®* DNA Polimerase (Promega). A reacção de PCR incluiu uma desnaturação inicial a 94°C durante 10 minutos, seguindo-se 35 ciclos, cada um composto por 30 segundos de desnaturação a 94°C, 30 segundos de *annealing* a 54°C e 1 minuto de extensão a 72°C. Seguiu-se um período de extensão final a 72°C por 10 minutos.

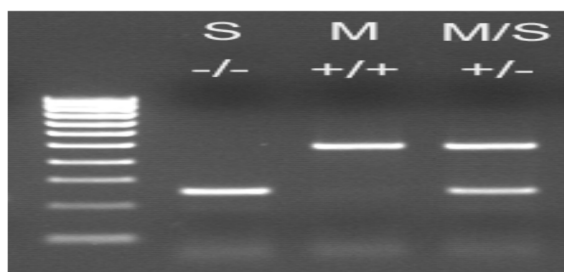


Figura 2.5 – Identificação das formas moleculares *An. gambiae* s.s. por amplificação do retrotransposão SINE200X1.6. Poço 1 – marcador de peso molecular de 1kb; poço 2 – *An. gambiae* s.s. forma S; poço 3 – *An. gambiae* s.s. forma M; poço 4 – *An. gambiae* s.s. híbrido M/S (adaptado de Santolamazza *et al.*, 2008).

Os produtos obtidos por PCR (SINE200X1.6) e PCR-RFLP (IGS) foram separados por electroforese horizontal em gel de agarose 2% (Agarose LE, Lonza) em tampão TBE 1X (TBE *buffer* 10X, Applichem) com brometo de etídeo 10mg/ml (Sigma). Foram aplicados no gel 15µl de amostra e 5µl de marcador de peso molecular de 100 pb (Promega). A electroforese decorreu a 130V durante 60 minutos e as bandas foram visualizadas num transiluminador de luz UV e fotografadas num sistema Uvidoc (Uvitec).

Os exemplares adultos capturados em repouso no interior de habitações por aspiração manual ou com lençol e piretrina foram identificados molecularmente na Universidade de Roma “La Sapienza” por uma técnica de IMP-PCR descrita por Wilkins *et al.* (2006). Esta metodologia também utiliza um *primer* universal e *primers* específicos para cada espécie. No entanto, estes *primers* incorporam *mismatches* intencionais no terceiro nucleótido da extremidade 3', de modo a permitir identificar as formas moleculares de *An. gambiae* s.s. sem ser necessária uma restrição enzimática – o *primer* utilizado para identificar *An. gambiae* s.s. possui um *mismatch* de base única que distingue entre as formas M e S.

2.4.2 – Genotipagem do gene TEP1 por PCR-RFLP

A genotipagem do gene TEP1 foi feita através de um ensaio de PCR-RFLP adaptado de um protocolo gentilmente fornecido pela Dr. E. Levashina, Max Planck Institute (Berlim, Alemanha). Este protocolo permite a identificação dos alelos S1, S2, R1 e R2 associados à resistência e susceptibilidade à infecção por *Plasmodium* no mosquito (Blandin *et al.*, 2009). O protocolo original utiliza uma técnica de *Nested* PCR, na qual um fragmento de 891 pb é inicialmente amplificado, seguindo-se a amplificação de um fragmento interno de 757 pb. Devido ao aparecimento de produto inespecífico e ao excesso de produto amplificado obtido pelo primeiro PCR, foram feitas algumas alterações ao protocolo original, tendo sido eliminada a primeira reacção de PCR.

A mistura de reacção, de volume total 50µl, foi composta por 1µl de DNA *template*; Tampão *Green GoTaq®* (Promega) a 1X; 1,5mM de MgCl₂ (Promega); 0,2mM de cada dNTP (Promega); 0,2µM de *primer* AG1656 [5'–ATC TAA TCG ACA AAG CTA CGA ATT T–3']; 0,2µM de *primer* AG1653 [5'–CTT CAG TTG AAC

GGT GTA GTC GTT–3’]; e 0,5U de *Go Taq*® DNA Polimerase (Promega). A reacção de PCR incluiu uma desnaturação inicial a 95°C durante 5 minutos, seguindo-se 40 ciclos, compostos cada um por 30 segundos de desnaturação a 95°C, 30 segundos de *annealing* a 55°C e 1 minuto de extensão a 72°C. Seguiu-se um ciclo de extensão final a 72°C por 10 minutos.

Os produtos de amplificação foram sujeitos a restrição enzimática com três enzimas de restrição diferentes (*Hind* III, *Bam*H I e *Bse*N I), sendo que a digestão com cada enzima foi feita em separado. Para a digestão com *Hind* III (a 37°C durante 1 hora), a 10µl de produto amplificado adicionou-se Tampão R⁺ (Thermo Scientific) 1X e 0,67U/µl de *Hind* III (Thermo Scientific). Para a digestão com *Bam*H I (a 37°C durante 1 hora), a 10µl de produto amplificado adicionou-se Tampão *Bam*H I, Lsp1109I, Sgel (Fermentas) 1X e 0,67U/µl *Bam*H I (Fermentas). Para a digestão com *Bse*NI (a 65°C durante 1 hora), a 10µl de produto amplificado adicionou-se Tampão B (Thermo Scientific) 1X e 0,67U/µl *Bse*N I (Thermo Scientific). As misturas de reacção para cada enzima foram completadas com ddH₂O para um volume total de 15µl.

A separação dos produtos de restrição foi efectuada por electroforese horizontal em gel de agarose 2% (Agarose LE, Lonza) em TBE 1X (TBE buffer 10X, Applichem) com brometo de etídeo 10mg/ml (Sigma). Foram aplicados no gel 15µl de amostra e 5µl de marcador de peso molecular de 100 pb (Promega). O gel foi submetido a uma corrente eléctrica de 130V durante 60 minutos e as bandas foram visualizadas num transiluminador de luz UV e fotografadas num sistema Uvidoc (Uvitec). A combinação dos padrões de restrição destas três enzimas permitiu a identificação dos alelos TEP1, de acordo com o esquema apresentado na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Tamanho dos fragmentos de restrição do gene TEP1 para cada enzima e genótipo correspondente.

Genótipo	Enzima <i>BamHI</i> (pb)	Enzima <i>HindIII</i> (pb)	Enzima <i>BseNI</i> (pb)
S1/S1	764	657 108	537 227
S1/S2	764	657 108	764 537 227
S1/R1	764 399 365	764 657 108	764 537 227
S1/R2	764 399 365	764 657 108	663 537 227 101
S2/S2	764	657 108	764
S2/R1	764 399 365	764 657 108	764
S2/R2	764 399 365	764 657 108	764 663 101
R1/R1	399 365	764	764
R1/R2	399 365	764	764 663 101
R2/R2	399 365	764	663 101

S1; S2 – alelos do gene TEP1 associados à susceptibilidade à infecção por *Plasmodium* no mosquito. R1; R2 - alelos do gene TEP1 associados à resistência à infecção por *Plasmodium* no mosquito (Blandin *et al.*, 2009).

2.4.3 – Sequenciação do gene TEP1

A metodologia utilizada para amplificação por PCR de um fragmento de 450 pb do domínio TED do gene TEP1 foi gentilmente cedida pelo Dr. E. Mancini, da Universidade de Roma “La Sapienza” (Itália). O ensaio de PCR utiliza um *primer forward* descrito por Obbard *et al* (2008) e um novo *primer reverse* (E. Mancini, comunicação pessoal), que previne a amplificação inespecífica do gene TEP6, um problema encontrado na aplicação dos primers originais de Obbard *et al.* (2008). A mistura de reacção, de volume total 50µl, foi composta por 1µl de DNA *template*; Tampão *Green GoTaq®* (Promega) a 1X; 2mM de MgCl₂ (Promega); 0,2mM de cada dNTP (Promega); 0,2µM de *primer* OB2996_F [5’–CAC GGT CAT CAA GAA CCT GGA C–3’]; 0,2µM de *primer* EMTep1a_R [5’–TCC AGC AAT GCC ATC AAC ACA

T–3’]; e 0,5U de *Go Taq*® DNA Polimerase (Promega). A reacção de PCR iniciou-se com uma desnaturação inicial a 94°C durante 2 minutos, seguindo-se 35 ciclos, cada um composto por 30 segundos de desnaturação a 94°C, 30 segundos de *annealing* a 54°C e 1 minuto de extensão a 68°C. Seguiu-se um período de extensão final a 68°C de 10 minutos.

A separação dos produtos amplificados foi efectuada por electroforese horizontal em gel de agarose 2% (Agarose LE, Lonza) em TBE 1X (TBE *buffer* 10X, Applichem) com brometo de etídeo 10mg/ml (Sigma). Foram aplicados no gel 5µl de amostra e 5µl de marcador de peso molecular de 100 pb (Promega). O gel foi submetido a uma corrente eléctrica de 130V durante 60 minutos e as bandas foram visualizadas num transiluminador de luz UV e fotografadas num sistema Uvidoc (Uvitec).

O restante produto amplificado foi purificado por um kit comercial (QIAquick® PCR Purification Kit, Qiagen). Cada produto purificado foi eluído em 30µl de ddH₂O.

Os fragmentos amplificados foram sequenciados em ambas as direcções (*forward* e *reverse*), utilizando os mesmos *primers* do PCR (OB2996_F e EMTepl1a_R), preparados a uma concentração de 10mM. A sequenciação de DNA foi realizada numa empresa especializada (StabVida), com base em protocolos padronizados, num sistema de sequenciação automática ABI 3730XL (Applied Biosystems).

O fragmento amplificado permite identificar os alelos associados à resistência R1 e R2 (Blandin *et al.*, 2009) mas não permite a distinção entre os alelos associados à susceptibilidade, S1 e S2.

2.5 – Análise das sequências do gene TEP1

O alinhamento das sequências de DNA foi realizado com recurso ao programa BioEdit versão 7.1.3.0 (Hall, 1999). A pesquisa de picos duplos (heterozigóticos) foi feita através da visualização dos cromatogramas e a correcção do alinhamento foi feita manualmente. A fase gamética das sequências de cada indivíduo foi determinada com recurso ao programa DnaSP 5.0 (Librado & Rozas, 2009).

Com recurso ao mesmo programa, calcularam-se estimativas de polimorfismo e diversidade genética no gene TEP1. Os parâmetros estimados foram:

- Número de posições de segregação (S) – número de posições, num conjunto de sequências de DNA homólogas, onde estão presentes dois ou mais nucleótidos diferentes (Fu, 1995);
- Número de haplótipos (h) – número de haplótipos diferentes entre as sequências de DNA analisadas;
- Diversidade haplotípica (Hd) – índice de singularidade de um haplótipo num conjunto de sequências. Hd é calculado através da seguinte fórmula:

$$Hd = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{i=1} x_i^2\right),$$

onde n é o número de sequências de DNA analisadas e x_i^2 é a frequência relativa de um determinado haplótipo (Nei & Tajima, 1980);

- Diversidade nucleotídica nas posições sinónimas (π_s) e nas posições não sinónimas (π_{ns}) – número médio de diferenças nucleotídicas, por posição sinónima ou não sinónima, respectivamente, entre um conjunto de sequências de DNA homólogas. π é calculado através da seguinte fórmula:

$$\pi = 2 \sum_{i < j} \hat{d}_{ij} / [n(n-1)],$$

onde \hat{d}_{ij} é uma estimativa do número de substituições nucleotídicas por posição, entre as sequências i e j , e n é o número de sequências de DNA analisadas (Nei & Miller, 1990).

Foram ainda efectuados os seguintes testes de neutralidade, para avaliar a possibilidade da existência de pressão selectiva sobre o gene TEP1:

- Testes D^* e F^* (Fu & Li, 1992) – baseiam-se na estimativa de θ para mutações observadas nas ramificações internas e para mutações observadas nas ramificações externas da genealogia dos haplótipos. θ é igual a $4N_e\mu$, onde N_e é o tamanho efectivo populacional e μ a taxa de mutação.
- Teste F_s (Fu, 1997) – baseia-se no cálculo da frequência de haplótipos para determinado valor de θ , valor este que é calculado com base em k , o número médio de diferenças nucleotídicas entre pares de sequências.
- Teste D (Tajima, 1989) – baseia-se na diferença entre dois valores de θ , um calculado com base em S e outro com base em k . Segundo o modelo de mutação neutral, estes dois valores devem ser iguais, pelo que uma

diferença entre os mesmos pode ser indicativo da existência de pressão selectiva.

Valores positivos para estes testes indicam a existência de selecção balanceada e valores negativos a existência de selecção positiva (Biswas & Akey, 2006).

Recorreu-se ainda ao programa MEGA 5.05 (Tamura *et al.*, 2011) para elaborar uma árvore filogenética do tipo *Neighbor-Joining*, segundo o método de Jukes-Cantor (Jukes & Cantor, 1969). Para elaborar esta árvore foi seleccionada apenas uma sequência representativa de cada haplótipo.

2.6 – Análise Estatística

Para avaliar a homogeneidade dos marcadores moleculares diagnósticos utilizados na identificação das espécies e formas moleculares do complexo *An. gambiae*; da frequência destas espécies e formas moleculares de acordo com o local/método de colheita; e para avaliar a variação das espécies e formas moleculares ao longo do desenvolvimento larvar nos criadouros permanentes, foi utilizado o teste de Chi-Quadrado de Pearson (χ^2) em tabelas de contingência (Sokal *et al.*, 1981 e Kirkwood, 1988). Neste estudo, o nível de significância utilizado foi de 5%, logo a H_0 (hipótese nula) foi rejeitada para valores de P (probabilidade) inferiores a 0,05.

No entanto, o teste de Chi-Quadrado não deve ser utilizado para amostras pequenas – quando a frequência esperada de qualquer célula for inferior a 1 ou inferior a 5 em 20% das células (Preacher, 2001). Nestas situações foi utilizado o Teste de Fisher. Este teste calcula as probabilidades exactas da tabela de contingência e de todas as outras tabelas que possam ser obtidas com os mesmos totais para as linhas e colunas.

Estes testes estatísticos foram realizados com recurso ao website “SOCR: Statistics Online Computacional Resource”.

Para avaliar potenciais diferenças na qualidade do DNA extraído nas várias amostras analisadas neste estudo, aplicou-se o teste de Wilcoxon, recorrendo ao programa SPSS, versão 20.0 (IBM Corp., 2011).

3. RESULTADOS

3.1 – Descrição da amostra

Na elaboração deste estudo, foram analisados um total de 419 culicídeos: 305 larvas, capturadas no criadouro permanente (n=95) e nos criadouros temporários (n=210); e 114 adultos, capturados no interior de habitações humanas por armadilhas luminosas do tipo CDC (n=100) ou em repouso (n=14). A Tabela 3.1 apresenta o número de larvas capturadas por cada estado larvar para os dois tipos de criadouros.

Tabela 3.1 – Número de larvas capturadas em Antula, por tipo de criadouro e estado larvar (L1 a L4).

Local de Captura	Estado Larvar					Total
	L1	L2	L3	L4	<i>a</i>	
Criadouros Temporários	51	79	44	36	0	210
Criadouro Permanente	14	21	29	15	16	95
Total	65	100	73	51	16	305

a - indivíduos capturados na forma larvar (sem informação sobre o estado larvar à data da captura) e que foram criados até à fase adulta, tendo sido conservados nesse estado.

3.2 – Identificação molecular

Dos 419 indivíduos amostrados, apenas se conseguiu a identificação molecular para 340. As 79 larvas capturadas no criadouro permanente, e sobre as quais existia informação do estado larvar à data da captura, foram identificadas morfológicamente como *Anopheles sp.* ou como *An. gambiae s.l.*, mas os ensaios de PCR e PCR-RFLP foram negativos, apesar de nos mesmos ensaios terem sido utilizados controlos positivos (larvas de *An. gambiae s.s.* de colónia) que amplificaram correctamente.

Para despistar eventuais problemas na extracção de DNA na amostra de larvas capturadas no criadouro permanente, foi feita uma comparação das concentrações de DNA e dos rácios de absorvância entre 260nm e 280nm (daqui em diante rácio 260/280) entre as várias amostras processadas (Tabela 3.2). Observaram-se diferenças significativas entre os valores médios de concentração de DNA (teste de Wilcoxon, $p < 0,001$) para as quatro amostras, mas este valor foi semelhante entre larvas e adultos provenientes dos criadouros permanentes. Inversamente, não se observaram diferenças significativas na média geral do rácio 260/280 (teste de Wilcoxon, $p = 0,790$) e a amostra de larvas capturadas no criadouro permanente foi inclusive, a que mais se aproximou do valor limite de pureza do DNA (1,8).

Tabela 3.2 – Concentração e grau de pureza do DNA extraído

	N	[DNA] (ng/μl)	Abs ₂₆₀ /Abs ₂₈₀
Criadouros Temporários	210	33,88 (29,03 – 38,73)	2,12 (2,06 – 2,19)
Criadouro Permanente (larvas)*	79	17,68 (14,00 – 22,63)	1,91 (1,82 – 2,00)
Criadouro Permanente (adultos)	16	16,21 (13,74 – 18,67)	2,19 (2,05 – 2,32)
Adultos (armadilhas CDC)	100	26,22 (23,14 – 29,31)	1,97 (1,94 – 2,01)

N – número de indivíduos; [DNA] (ng/μl) – média da concentração de DNA em ng/μl; Abs₂₆₀/Abs₂₈₀ – média do rácio 260/280; * - indivíduos negativos para os ensaios de PCR e PCR-RFLP. Os valores entre parêntesis representam o intervalo de confiança a 95%.

Deste modo, para o criadouro permanente, a amostra ficou reduzida às 16 larvas que se desenvolveram até à fase adulta.

No total, *An. gambiae* s.s. foi a espécie mais abundante (62,65%), seguida da espécie *An. arabiensis* (36,47%) (Tabela 3.3). Somente 0,88% da amostra total foi identificada como *An. melas*, que foi capturado apenas na forma adulta. Reportando às formas moleculares de *An. gambiae* s.s., a forma S foi predominante (51,17%) relativamente à forma M (19,25%). Híbridos M/S constituíram 29,58% da amostra total (Tabela 3.3).

Tabela 3.3 – Frequência de cada espécie/forma molecular por local de colheita, no caso das larvas ou método de colheita, no caso dos adultos.

		<i>Anopheles gambiae</i> s.s.			<i>Anopheles arabiensis</i>	<i>Anopheles melas</i>	Total
		M	S	M/S			
Larvas	Criadouros Temporários	11,43 (24)	25,24 (53)	10,47 (22)	52,86 (111)	-	210
	Criadouro Permanente	-	6,25 (1)	25,00 (4)	68,75 (11)	-	16
	Total	10,62 (24)	23,89 (54)	11,51 (26)	53,98 (122)	-	226
Adultos	CDC	15,00 (15)	53,00 (53)	29,00 (29)	-	3,00 (3)	100
	IR ^b	14,29 (2)	14,29 (2)	57,13 (8)	14,29 (2)	-	14
	Total	14,91 (17)	48,25 (55)	32,46 (37)	1,75 (2)	2,63 (3)	114
Total		12,06 (41)	32,06 (109)	18,53 (63)	36,47 (124)	0,88 (3)	340

CDC – colheita através de armadilhas luminosas do tipo CDC; IR – colheita em repouso com recurso a aspirador manual ou com lençol e piretrina; M – *An. gambiae* s.s. forma M; S – *An. gambiae* s.s. forma S; M/S – *An. gambiae* s.s. híbrido M/S. ^b – identificação molecular efectuada na Universidade “La Sapienza”, Roma, Itália, pelo grupo da Dr. Alessandra della Torre, por IMP-PCR (Wilkins *et al.*, 2006). Valores em percentagem e número total em parêntesis.

As formas moleculares dos 213 exemplares identificados como *An. gambiae* s.s. através do marcador IGS foram também analisadas pelo marcador SINE200X1.6 (Tabela 3.4). No geral, observou-se uma concordância de 91% na identificação pelos dois marcadores, não existindo uma diferença estatisticamente significativa entre a composição das formas identificada pelos dois marcadores ($\chi^2 = 3,809$; g.l. 2; $p = 0,149$, Tabela 3.4). Onze indivíduos foram identificados como forma M ou S para o marcador IGS e híbrido M/S para o marcador SINE200X1.6; dezassete como híbrido M/S para o marcador IGS e forma M ou S para o marcador SINE200X1.6; um como forma M para o marcador IGS e forma S para o marcador SINE200X1.6 e um como forma S para o marcador IGS e forma M para o marcador SINE200X1.6. Nas análises subsequentes, os exemplares foram classificados quanto à sua forma molecular segundo o marcador IGS.

Tabela 3.4 - Comparação entre os marcadores IGS e SIN200X1.6 para a identificação de formas moleculares de *An. gambiae* s.s.

Marcador molecular	<i>An. gambiae</i> s.s.		
	M	S	M/S
IGS	19,25 (41)	51,17 (109)	29,58 (63)
SINE200X1.6	15,49 (33)	60,56 (129)	23,95 (51)

M – *An. gambiae* s.s. forma M; S – *An. gambiae* s.s. forma S; M/S – *An. gambiae* s.s. híbrido M/S. Valores em percentagem e número total em parêntesis.

3.3 - Distribuição de espécies e formas moleculares por método de colheita

A distribuição das espécies não foi homogênea relativamente à fase do ciclo de vida em que foram capturadas nem ao método de colheita aplicado (Tabela 3.3). *Anopheles gambiae* s.s. foi a única espécie capturada por todos os métodos, sendo a predominante nas colheitas de adultos (95,61%). Já na amostra larvar *An. gambiae* s.s. é superado por *An. arabiensis* (53,98% vs. 46,02%). Esta espécie foi capturada tanto nos criadouros larvares como na forma adulta, mas nesta última apenas através de colheitas de mosquitos em repouso, onde constituiu 14,29% da amostra. Não foram encontrados *An. arabiensis* nas colheitas com armadilhas CDC. A proporção de *An. arabiensis* adultos (1,75%) foi bastante inferior à proporção encontrada nas larvas (53,98%), uma diferença estatisticamente significativa ($\chi^2 = 8,319$; g.l. 1; $p = 0,004$, Tabela 3.3). Já *An.*

melas foi capturado apenas na forma adulta, com armadilhas do tipo CDC, e numa percentagem muito baixa (2,63% da amostra de adultos). Relativamente às formas moleculares de *An. gambiae s.s.*, a sua distribuição entre amostras larvares e adultas é homogénea ($\chi^2 = 3,009$; g.l. 2; $p = 0,222$, Tabela 3.3).

Analizou-se ainda a frequência de cada espécie e das formas moleculares de *An. gambiae s.s.* (Figura 3.1) por estado larvar (L1 a L4) nos criadouros temporários. Na Figura 3.1A, é possível observar um aumento gradual da frequência de *An. arabiensis* com o evoluir do estado larvar, com especial destaque para o estado L4. Enquanto nos três primeiros estados larvares as frequências de *An. gambiae s.s.* e de *An. arabiensis* se mantêm homogéneas ($\chi^2 = 1,758$; g.l. 2; $p = 0,415$), em L4 há um aumento significativo de *An. arabiensis*, que passa a representar 83,33% das larvas colhidas ($\chi^2 = 17,95$; g.l. 3; $p < 0,001$).

Relativamente às formas moleculares de *An. gambiae s.s.* (Figura 3.1B), a sua distribuição é também homogénea entre L1 e L3 ($\chi^2 = 4,013$; g.l. 4; $p = 0,404$), mas esta homogeneidade perde-se quando se adiciona o estado L4 à análise (Teste de Fisher: $p < 0,001$). Neste estado, não foram identificadas larvas da forma M.

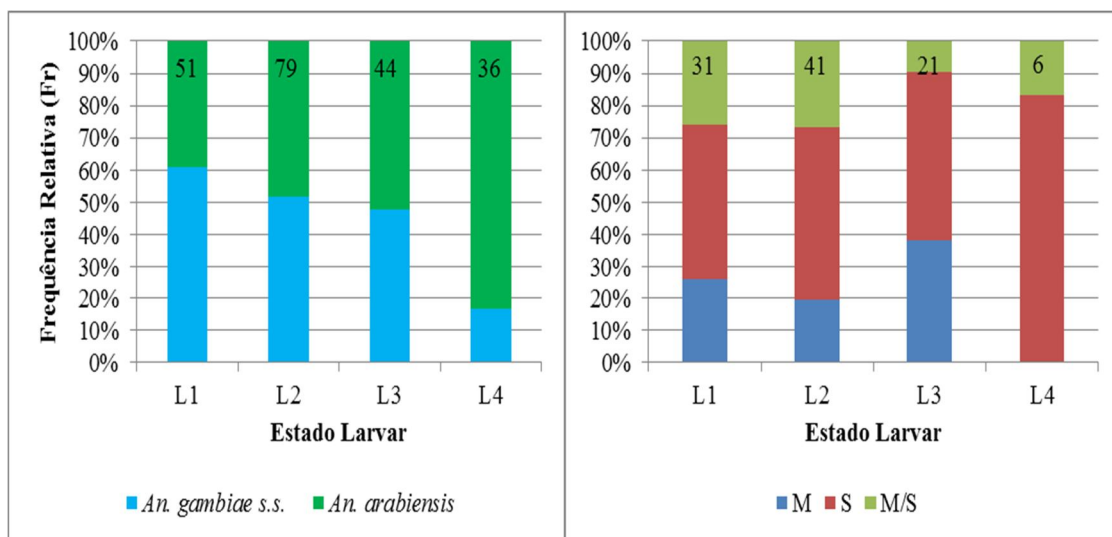


Figura 3.1 – A. Frequência de *An. gambiae s.s.* vs. *An. arabiensis* por estado larvar nos criadouros temporários ($\chi^2 = 17,95$; g.l. 3; $p = 0,001$). **B.** Frequência das formas moleculares de *An. gambiae s.s.* por estado larvar nos criadouros temporários (Teste de Fisher: $p < 0,001$). M – *An. gambiae s.s.* forma M; S – *An. gambiae s.s.* forma S; M/S – *An. gambiae s.s.* híbrido M/S. Os números em cada coluna indicam o número total de indivíduos capturados em cada estado larvar.

3.4 – Genotipagem do gene TEP1 por PCR-RFLP

Para as análises do gene TEP1, foram incluídas todas as larvas identificadas e os adultos *Anopheles gambiae* s.s. capturados através de armadilhas do tipo CDC. Não foram analisados adultos capturados em repouso. Inicialmente, calcularam-se as frequências de cada genótipo e de cada alelo para as larvas (Tabela 3.5). Na população larvar, o alelo S1 é o mais frequente, estando presente em todos os indivíduos analisados, essencialmente em homozigotia (95,13%). Já os alelos resistentes R1 e R2 encontram-se presentes somente em heterozigotia com o alelo S1. O alelo R1 foi encontrado exclusivamente na forma M e o alelo R2 foi detectado nas duas formas e em *An. arabiensis*. Não se verificou a ocorrência do alelo S2, nem de indivíduos homozigóticos para qualquer dos alelos associados à resistência à infecção (R1 ou R2) ou heterozigóticos R1/R2.

As frequências genotípicas do TEP1 foram semelhantes entre amostras de imaturos e adultos de *An. gambiae* s.s. (Figura 3.2). Em ambas, houve uma predominância do genótipo S1/S1, sendo a principal diferença a ocorrência do genótipo S1/S2 (e do alelo S2) na amostra de adultos, com uma frequência de 4,12%. Este genótipo foi identificado em três híbridos M/S e num indivíduo da forma S. O alelo S2 não foi detectado na amostra de imaturos. Nos adultos, o genótipo S1/R2 foi identificado num híbrido M/S e o genótipo S1/R1 na forma M. Tal como nas larvas, também não foram encontrados nos adultos indivíduos homozigóticos para os alelos R1 ou R2, nem heterozigóticos R1/R2.

Tabela 3.5 – Frequência de cada genótipo e de cada alelo do gene TEP1 para as larvas de *An. gambiae* s.s. e de *An. arabiensis*.

		<i>An. gambiae</i> s.s.			<i>An. arabiensis</i> (122)	Total (226)
		M (24)	S (55)	M/S (26)		
Genótipos	S1/S1	83,33 (20)	98,15 (53)	100 (26)	95,08 (116)	95,13 (215)
	S1/R1	12,50 (3)	-	-	-	1,33 (3)
	S1/R2	4,17 (1)	1,85 (1)	-	4,92 (6)	3,54 (8)
Alelos	S1	91,67 (44)	99,07 (107)	100 (52)	97,54 (238)	97,57 (441)
	R1	6,25 (3)	-	-	-	0,66 (3)
	R2	2,08 (1)	0,93 (1)	-	2,46 (6)	1,77 (8)

Valores em percentagem e número total em parêntesis.

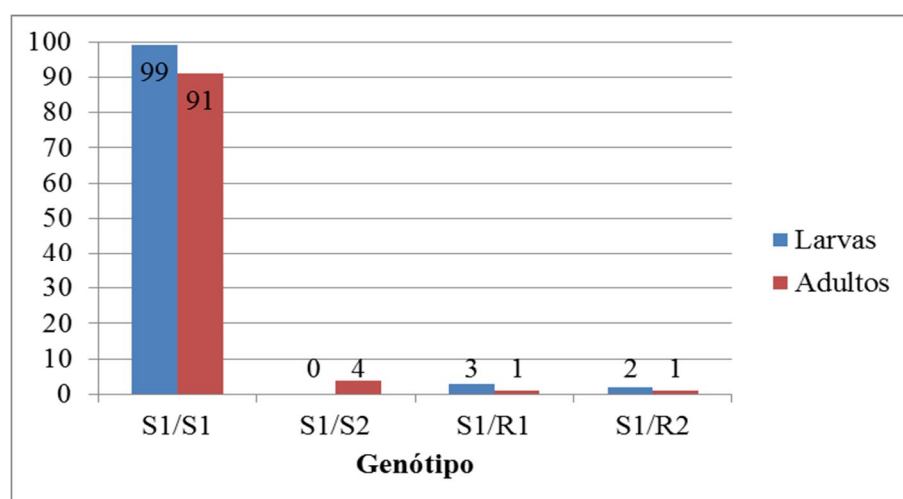


Figura 3.2 – Genótipos representativos do gene TEP1 identificados em larvas e adultos de *An. gambiae* s.s. Os números registados em cada coluna indicam o número de indivíduos possuidores da cada genótipo.

3.5 – Sequenciação e diversidade do gene TEP1

Oitenta e um indivíduos foram seleccionados para sequenciação do gene TEP1: quarenta larvas capturadas nos criadouros temporários (dez exemplares da forma M, dez da forma S, dez híbridos M/S e dez *Anopheles arabiensis*), dezasseis larvas capturadas no criadouro permanente (um exemplar da forma S, quatro híbridos M/S e onze *An. arabiensis*) e vinte e cinco adultos (cinco exemplares da forma M, dez da forma S e dez híbridos M/S). Para as larvas dos criadouros temporários e para os adultos, foram apenas seleccionados exemplares cuja identificação tivesse sido consistente pelos dois marcadores moleculares utilizados (IGS e SINE200X1.6). Como apenas cinco adultos da forma M foram consistentes para os dois marcadores, apenas se sequenciaram esses cinco exemplares. Relativamente às larvas do criadouro permanente, como apenas dezasseis indivíduos estavam disponíveis, todos foram utilizados, independentemente da consistência das identificações. Não foram analisados adultos capturados em repouso.

As estimativas de polimorfismo para o gene TEP1 estão apresentadas na Tabela 3.6. No total das 162 sequências analisadas, foram detectadas 51 posições polimórficas (em 450 pb sequenciados) e 19 haplótipos diferentes. A diversidade haplotípica foi superior na forma M, com valores intermédios para os híbridos M/S e *An. arabiensis* e uma menor diversidade na forma S. Relativamente à diversidade nucleotídica, a forma

M apresentou uma vez mais uma maior diversidade. Nas restantes formas moleculares/espécies, esta foi muito inferior, destacando-se a menor diversidade nos híbridos M/S, que apresentou uma diversidade nucleotídica nos locais não-sinónimos (π_{ns}) muito inferior às restantes.

Tabela 3.6 – Polimorfismo, diversidade haplotípica e diversidade nucleotídica do gene TEP1 e testes de selecção

		<i>N</i>	<i>S</i>	<i>h</i>	<i>Hd</i>	π_s	π_{ns}	<i>D</i>	<i>D*</i>	<i>F*</i>	<i>Fs</i>
<i>An. gambiae</i> s.s.	Forma M	30	45	9	0,777	0,0507	0,0181	-0,818	1,502*	0,843	3,747*
	Forma S	42	40	7	0,556	0,0210	0,0053	-2,375*	-3,833*	-3,949*	1,488
	Híbrido M/S	48	6	7	0,700	0,0123	0,0008	-0,438	-0,528	-0,586	-1,640
<i>An. arabiensis</i>		42	43	9	0,669	0,0276	0,0051	-2,318*	-2,543	-2,929*	0,476

N – número de sequências; *S* – número de posições polimórficas; *h* – número de haplótipos; *Hd* – diversidade haplotípica; π_s – diversidade nucleotídica nas posições sinónimas; π_{ns} – diversidade nucleotídica nas posições não-sinónimas. Testes de neutralidade: *D* – teste *D* de Tajima; *D** e *F** – testes *D** e *F** de Fu e Li; *Fs* – teste *Fs* de Fu. Valores marcados com * são estatisticamente significativos ($P < 0,05$).

As Figuras 3.3 e 3.4 apresentam uma comparação da diversidade do gene TEP1 entre larvas e adultos. A diversidade haplotípica (*Hd*) foi superior nos adultos relativamente às larvas, tanto para a forma M como para a forma S, mas semelhante para híbridos M/S. Já a diversidade nucleotídica nas posições não-sinónimas (π_{ns}) foi superior nas larvas da forma S e híbridos M/S relativamente aos adultos, tendo-se verificado o oposto para a forma M.

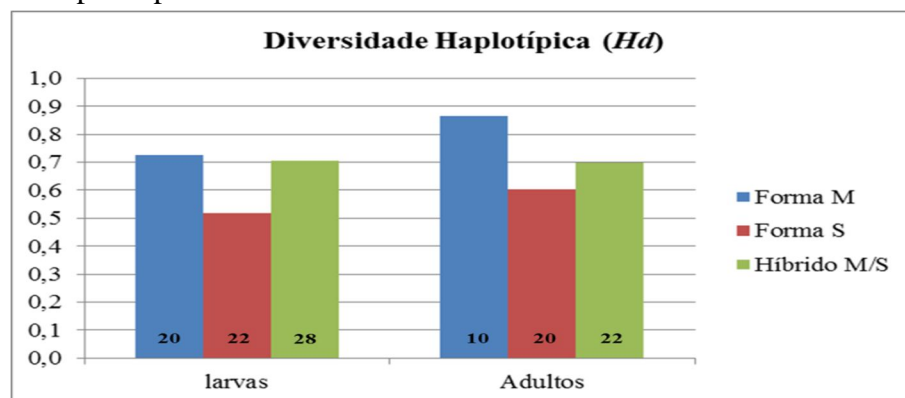


Figura 3.3 – Variação da diversidade haplotípica (*Hd*) do gene TEP1 entre larvas e adultos das diferentes formas moleculares de *An. gambiae* s.s.. M – *An. gambiae* s.s. forma M; S – *An. gambiae* s.s. forma S; M/S – *An. gambiae* s.s. híbrido M/S. Os números registados em cada coluna indicam o número de sequências utilizadas.

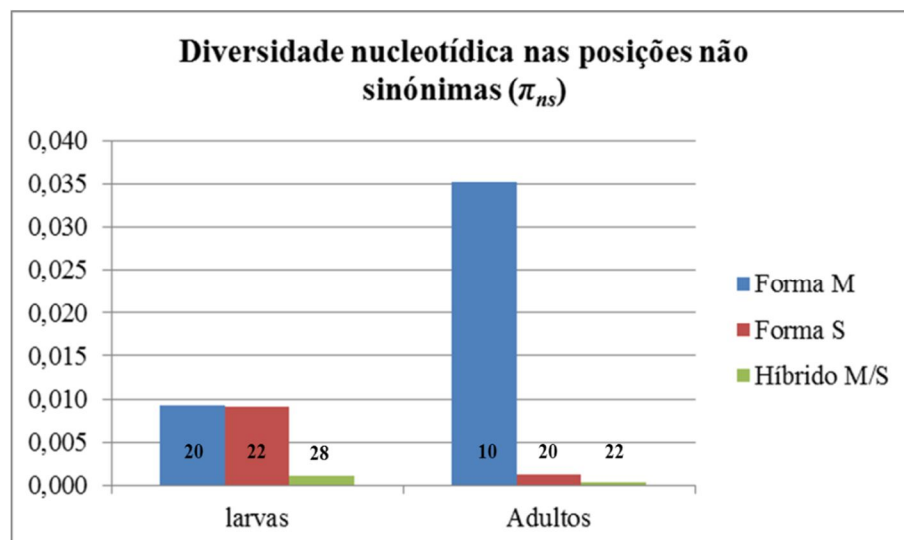


Figura 3.4 – Variação da diversidade nucleotídica nas posições não-sinónimas (π_{ns}) do gene TEP1 entre larvas e adultos das diferentes formas moleculares de *An. gambiae* s.s.. M – *An. gambiae* s.s. forma M; S – *An. gambiae* s.s. forma S; M/S – *An. gambiae* s.s. híbrido M/S. Os números registados em cada coluna indicam o número de sequências utilizadas.

Foram ainda efectuados testes de neutralidade (Tabela 3.6) que demonstraram a existência de desvios estatisticamente significativos. Os índices D , D^* e F^* demonstraram a existência de desvios na forma S e *An. arabiensis*, mas nenhum foi observado para híbridos M/S. Na forma M, apenas D^* revelou a existência de um desvio à neutralidade. O teste F_s de Fu revelou a existência de um desvio estatisticamente significativo apenas na forma M.

Analizou-se ainda a relação filogenética entre as sequências obtidas neste estudo e sequências do gene TEP1 anotadas no GenBank (Figura 3.5). Para o efeito, foi seleccionada uma sequência representativa de cada haplótipo para elaborar a árvore filogenética. Verificou-se que as sequências obtidas neste estudo (rectângulos azuis) se encontravam em dois grupos distintos: um com alelos susceptíveis (rectângulo vermelho) e um com alelos resistentes (rectângulo verde). No grupo dos alelos susceptíveis a sequência GAS_S_h19 apresentou alguma divergência, aparentemente numa posição intermédia entre alelos susceptíveis e resistentes. Já no grupo dos alelos resistentes foi possível visualizar dois sub-grupos: um no qual se encontravam as sequências AR_R2_h5; GAM_R2_h16 e GAS_R2_h18 e que corresponderia ao grupo dos alelos R2 e um outro onde se encontrava a sequência GAM_R1_h14 e que corresponderia ao grupo dos alelos R1.

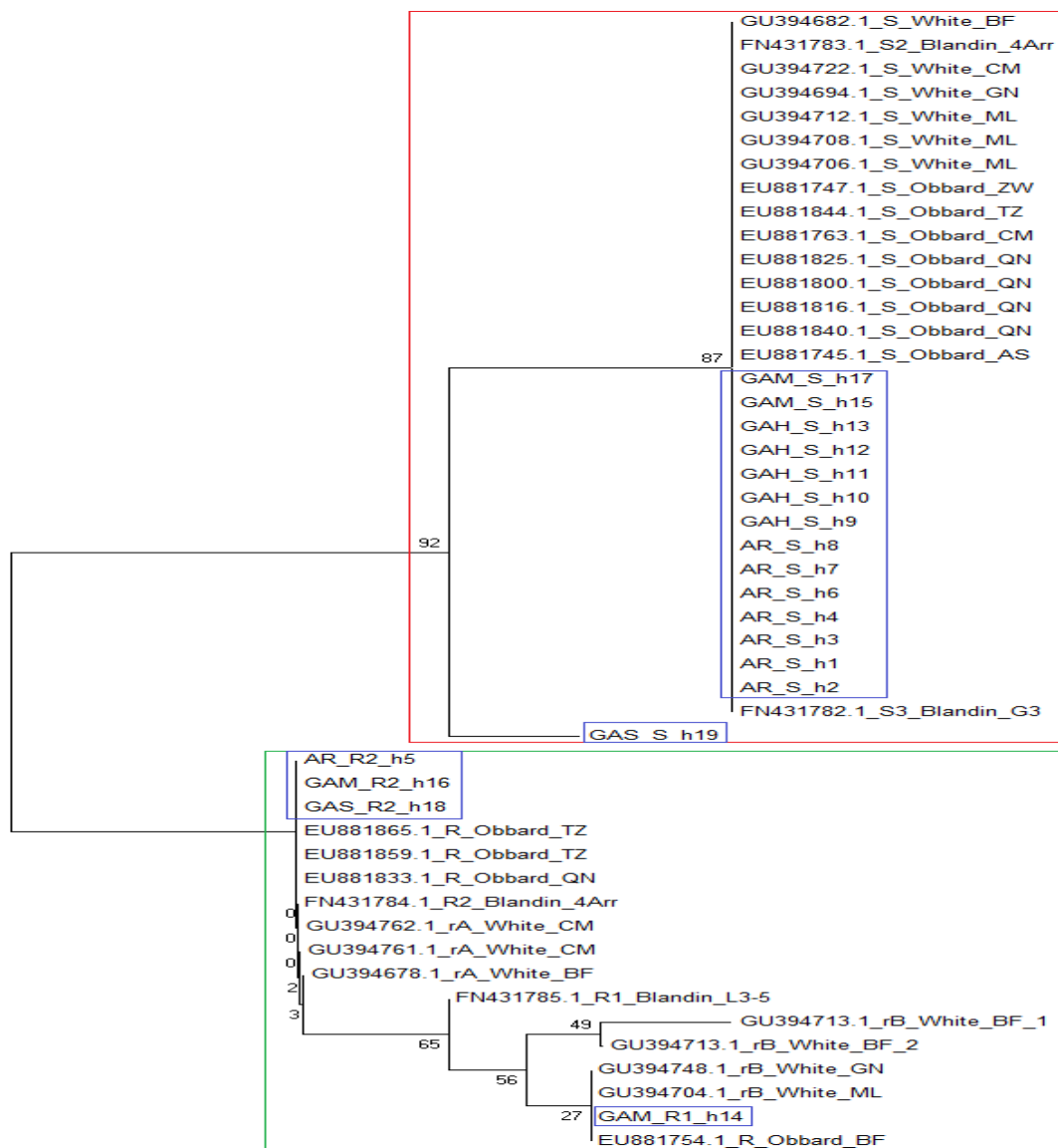


Figura 3.5 – Árvore filogenética (*Neighbour Joining*, segundo modelo de Jukes-Cantor) entre as sequências obtidas neste estudo (rectângulos azuis) e sequências do gene TEP1 anotadas no GenBank. O rectângulo vermelho representa o grupo dos alelos susceptíveis e o rectângulo verde o grupo dos alelos resistentes. As sequências analisadas estão identificadas por espécie (AR, *An. arabiensis*; GAM - *An. gambiae* s.s. forma M; GAS - *An. gambiae* s.s. forma S; GAH - *An. gambiae* s.s. híbrido M/S), alelo TEP1 (S, alelo TEP1 associado à susceptibilidade à infecção por *Plasmodium* no mosquito; R1 e R2, alelos TEP1 associados à resistência à infecção por *Plasmodium* no mosquito, Blandin *et al.*, 2009) e número do haplótipo (h1 a h19), respectivamente. As sequências obtidas a partir do GenBank estão identificadas com o número de acesso no GenBank, alelo TEP1 (S, alelo TEP1 associado à susceptibilidade à infecção por *Plasmodium* no mosquito; R1, R2, rA, rB e R, alelos TEP1 associados à resistência à infecção por *Plasmodium* no mosquito, Blandin *et al.*, 2009; White *et al.*, 2010; Obbard *et al.*, 2008), autor e país de captura do indivíduo (AS, África do Sul; BF, Burkina Faso; CM, Camarões; GN, Gana; ML, Mali; QN, Quênia; TZ, Tanzânia; ZW, Zimbabué), respectivamente.

4. DISCUSSÃO

4.1 – Identificação molecular

Neste estudo, não foi possível identificar molecularmente as 79 larvas capturadas no criadouro permanente. Os motivos que levaram a esta falha não são claros. Apesar de se terem observado diferenças significativas entre os valores médios da concentração de DNA entre as quatro amostras analisadas (Tabela 3.2), o valor obtido para as 79 larvas do criadouro permanente foi muito semelhante (sendo ligeiramente superior) ao obtido para os adultos do mesmo criadouro. Por outro lado, não se verificaram diferenças significativas entre as médias do rácio 260/280, que avalia o grau de pureza do DNA. Aliás, o valor obtido para as larvas capturadas no criadouro permanente (1,91) foi o que mais se aproximou do valor limite de pureza do DNA (1,8), abaixo do qual se considera a existência de contaminação com proteínas, fenol ou outros contaminantes, situando-se também abaixo do valor para o qual se assume a possibilidade de contaminação com RNA (Sauer *et al.*, 2008). Não parece, portanto, que os problemas de amplificação por PCR sejam consequência de má qualidade ou quantidade do DNA extraído. Esta ideia é reforçada pelo facto de as larvas de *Anopheles gambiae* s.s. de colónia (controlos positivos de extracção de DNA) terem amplificado correctamente nos ensaios de PCR e PCR-RFLP. A possibilidade de as 79 larvas negativas para os ensaios de PCR e PCR-RFLP não pertencerem ao complexo *An. gambiae* pode também ser considerada, pois já foi reportada a existência de outros anofelíneos na região de Antula (Palsson *et al.*, 2004). No entanto, parece ser pouco provável que os 16 indivíduos colectados na forma larvar e criados até à fase adulta pertencessem todos ao complexo *An. gambiae*, enquanto nenhum dos restantes 79 indivíduos colectados no mesmo local fizesse parte desse mesmo complexo. Finalmente, a possibilidade da presença de um contaminante da enzima *Taq* DNA polimerase na água dos criadouros poderia explicar os resultados negativos obtidos.

Neste estudo, observou-se que o complexo *An. gambiae* em Antula se encontra representado por três espécies. A presença de *An. gambiae* s.s. e de *An. melas* nesta localidade não constitui um dado novo, pois estas espécies tinham já sido reportadas em anos anteriores na mesma região (Pinto *et al.*, comunicação pessoal, Palsson *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2008). Já a presença de *An. arabiensis* na região é um novo registo. Apesar de já ter sido identificada no interior da Guiné-Bissau (Petrarca *et al.*, 1983), esta espécie nunca tinha sido reportada em Antula ou na área de Bissau.

O facto de não terem sido identificados exemplares de *An. arabiensis* nas capturas com armadilhas CDC pode ser indicativo de que estamos na presença de uma população exofágica, uma vez que aquele método de colheita é eficiente na captura de mosquitos em busca de um hospedeiro para a realização de uma refeição sanguínea. A ausência desta espécie, até ao ano de 2010, nas capturas em repouso efectuadas no interior de habitações humanas, pode ser indicativa de uma população com tendências exofílicas e que, devido a este comportamento, nunca tinha sido identificada nesta região. No entanto, para a região de Antula, não existem dados sobre capturas em repouso no exterior de habitações humanas, que permitam a comparação entre locais de repouso e, consequentemente, não é possível confirmar essa potencial exofilia.

Outra explicação para este resultado é a introdução recente desta espécie em Antula, possivelmente proveniente de regiões mais interiores da Guiné-Bissau. Para testar esta hipótese seria necessário avaliar e comparar o grau de parentesco e a diversidade genética das populações de *An. arabiensis* e de *An. gambiae* s.s. capturadas em Antula, no ano de 2010. Uma diversidade genética inferior na população de *An. arabiensis*, possivelmente associada a um maior nível de consanguinidade, poderia ser interpretada como consequência de um efeito fundador, indicando uma recente introdução nesta região (Sadava *et al.*, 2008). Para o efeito, está em curso a análise de microssatélites em amostras de imaturos e de adultos de *An. gambiae* s.s. e *An. arabiensis* colhidas neste estudo.

Relativamente à identificação molecular das formas M e S de *An. gambiae* s.s., os valores de concordância para os marcadores SINE200X6.1 e IGS observados neste trabalho (91%), embora superiores, são ainda comparáveis aos observados anteriormente para a Guiné-Bissau: 88% (Caputo *et al.*, 2011) e 69% (Santolamazza *et al.*, 2011). Tal como descrito por Caputo *et al.* (2011), a maioria das discrepâncias observadas no presente estudo, devem-se a: I) indivíduos identificados como híbridos M/S para o marcador IGS e como formas M ou S para o marcador SINE200X1.6, o que sugere que em locais de elevada hibridação, como é o caso da Guiné-Bissau, ocorre um processo de recombinação entre formas M e S na região centromérica do cromossoma X (onde estão localizados os dois marcadores); II) indivíduos que foram identificados como híbridos M/S para o marcador SINE200X1.6 e como formas M ou S para o marcador IGS. Estes indivíduos podem ser resultado de um viés técnico causado pela

ocorrência de um número desigual de cópias IGS (o rDNA é uma sequência repetitiva) da forma M ou S, o que resulta no surgimento de uma banda muito mais intensa de uma das formas na electroforese em gel de agarose.

4.2 – Distribuição de espécies e formas moleculares

Consistente com as capturas efectuadas anteriormente em Antula, a forma S foi predominante nesta região, com excepção do ano de 1996, onde a forma M foi capturada em maior frequência (Pinto *et al.*, comunicação pessoal; Oliveira *et al.*, 2008). A forma S foi também predominante nos criadouros temporários, correspondendo ao que seria expectável de acordo com as conclusões de Diabaté *et al.* (2005, 2008) sobre a maior capacidade de desenvolvimento desta forma neste tipo de biótopo larvar. No entanto, não se verificaram diferenças entre as frequências relativas das diferentes formas moleculares (híbridos incluídos) entre as amostras larvares e adultas. Deste modo, e porque não se obtiveram dados para o criadouro permanente que permitissem uma comparação entre os dois tipos de biótopos larvares, esta predominância pode ser explicada por uma maior ocorrência da forma S nesta região, e não somente pela sua maior aptidão em explorar criadouros temporários.

De facto, nos criadouros temporários, não se verificaram variações significativas na frequência relativa da forma S ao longo do desenvolvimento larvar, que pudessem consubstanciar a ideia de que esta forma iria aumentando a sua predominância durante o desenvolvimento. Verificou-se, contudo, uma diferença estatisticamente significativa entre o estado L4 e os restantes, como consequência do desaparecimento da forma M, mas o facto de apenas seis indivíduos terem sido amostrados neste estado não permite concluir sobre a verdadeira proporção entre formas moleculares.

Já o aumento significativo da frequência relativa de *An. arabiensis* ao longo do desenvolvimento larvar nos criadouros temporários, em detrimento de *An. gambiae* s.s., sugere uma maior adaptabilidade da primeira espécie a este tipo de criadouro. Dados obtidos anteriormente em ensaios laboratoriais (Schneider *et al.*, 2001; Kirby & Lindsay, 2009) e em condições naturais (Paaijmans *et al.*, 2009), sugerem que em criadouros com populações mistas, a mortalidade de *An. arabiensis* é superior à de *An. gambiae* s.s., sugerindo um fenómeno de competição larvar interespecífico favorável a *An. gambiae* s.s. No entanto, Kirby & Lindsay (2009), demonstraram também que a

temperatura em criadouros com baixa pressão de predadores (como é o caso dos criadouros temporários) afecta o desenvolvimento larvar: a taxa de desenvolvimento de *An. gambiae* s.s. a 30°C foi inferior quando na presença de *An. arabiensis* e, a 35°C, a taxa de sobrevivência foi superior para *An. arabiensis*. Paaijmans *et al.* (2009) referem ainda que em criadouros temporários de menores dimensões, onde a variação da temperatura durante o dia é mais elevada, a sobrevivência de *An. arabiensis* é superior. Outros factores como a densidade larvar e a qualidade e quantidade de nutrientes disponíveis podem ainda potenciar esta competição interespecífica. A não existência de dados relativos a estes factores nos criadouros temporários estudados em Antula, não permite concluir sobre que mecanismo(s) poderá(ão) estar na origem desta predominância de *An. arabiensis*. No entanto, o facto de terem sido amostradas diversas poças de água de dimensões reduzidas pode indicar que a temperatura e o tamanho do criadouro foram factores importantes no aparentemente mais favorável desenvolvimento de *An. arabiensis* nestes criadouros.

4.3 – Genotipagem do gene TEP1

A genotipagem do gene TEP1 revelou uma elevada frequência do alelo S1 na Guiné-Bissau. Ao contrário do que é observado noutros países do extremo ocidental de África (White *et al.*, 2011), onde o alelo R1 é mais prevalente, em Antula o alelo S1 surge em todos os indivíduos genotipados, especialmente em homozigotia. Os alelos associados à resistência ocorrem em frequências muito inferiores às observadas para países como o Mali ou o Burkina Faso e sempre em heterozigotia com o alelo S1. É possível que esta presença exclusiva em heterozigotia seja consequência de uma introdução recente dos alelos resistentes na população de *Anopheles gambiae* s.l. da Guiné-Bissau, tal como proposto para uma população do Gana (White *et al.*, 2011).

A associação do alelo R1 com a forma M foi também observada neste estudo (White *et al.*, 2011). Apesar de terem sido identificados apenas quatro indivíduos possuidores do alelo R1 (três larvas e um adulto), todos foram identificados como pertencentes à forma M, tal como descrito anteriormente. As três larvas possuidoras deste alelo foram colectadas nos criadouros temporários, onde a pressão de agentes patogénicos não será tão relevante como nos criadouros permanentes. No entanto, a

ausência de dados para criadouros permanentes impediu a comparação da frequência de R1 na forma M entre diferentes biótopos larvares.

Já o alelo R2 foi identificado quer nas formas M e S quer em *An. arabiensis*, o que é consistente com o observado por White *et al.* (2011). Sendo um alelo que confere apenas um fenótipo intermédio de resistência antiparasitária (Blandin *et al.*, 2009; White *et al.*, 2011), parece, ao contrário do que sucede para a forma M, não sofrer uma pressão selectiva suficiente que promova a sua associação à forma M.

As amostras adultas e larvares de *An. gambiae s.s.* não apresentaram diferenças significativas nas frequências dos genótipos TEP1, excepção feita à presença do alelo S2 na amostra adulta. Contudo, os alelos R1, R2 e S2 estão presentes em frequências muito baixas na região de Antula, pelo que se torna inviável avaliar potenciais diferenças significativas entre as duas amostras. Esta baixa frequência pode também justificar a ausência destes alelos em híbridos M/S.

4.4 – Sequenciação e diversidade do gene TEP1

A sequenciação do gene TEP1 revelou uma maior diversidade haplotípica e nucleotídica na forma M, o que pode reflectir a presença exclusiva do alelo R1 nesta forma. O facto de a forma M estar associada a biótopos larvares com maior pressão de agentes patogénicos (White *et al.*, 2011), parece justificar a manutenção de uma maior variabilidade haplotípica em genes do sistema imune (Rottschaefer *et al.*, 2011). Apesar da baixa frequência do alelo R1 na região de Antula, a manutenção do mesmo na população parece ser benéfica para a forma M. Este alelo é possivelmente mantido na forma M por um mecanismo de selecção balanceada, justificado pelo valor positivo observado para a esta forma molecular nos testes F_s de Fu (1997) e D^* de Fu e Li (1992).

Já a forma S, mais adaptada a criadouros temporários e, como tal menos sujeita a pressão de agentes patogénicos, apresenta uma menor diversidade do gene TEP1. Contrariamente ao que sucede para a forma M, na forma S o gene TEP1 parece estar sujeito a um mecanismo de selecção positiva (valores negativos para os índices D , D^* e F^*). O mesmo fenómeno parece verificar-se para *Anopheles arabiensis*.

A comparação da diversidade haplotípica (Hd) entre larvas e adultos de *An. gambiae s.s.* revelou uma maior diversidade haplotípica das formas M e S nos adultos.

Esta diferença provavelmente reflecte o facto de a amostra adulta ser mais representativa da população do que a amostra larvar. O facto de terem sido prospectados poucos criadouros larvares, o que pode ter resultado numa maior consanguinidade entre os indivíduos imaturos, pode justificar esta diferença.

De um mesmo modo, a comparação da diversidade nucleotídica nas posições não sinónimas (π_{ns}) entre larvas e adultos parece corroborar a existência de uma maior diversidade do gene TEP1 nos indivíduos M adultos, promovida por um processo de selecção balanceada que promove a manutenção de vários alelos na população (o que se reflecte no maior número de polimorfismos entre as sequências analisadas). Já em relação à forma S, os adultos apresentam um menor valor de π_{ns} , o que poderá ser uma consequência da selecção positiva nesta forma. Este tipo de selecção tende a induzir uma diminuição do número de polimorfismos (Meiklejohn, *et al.*, 2004; Biswas & Akey, 2006).

Já a baixa variabilidade dos índices de Hd e de π_{ns} entre larvas e adultos nos híbridos M/S é provavelmente uma consequência da presença exclusiva do alelo S1 nesta amostra.

A análise filogenética do gene TEP1 não revelou a existência de variações regionais deste gene, pois os haplótipos identificados na Guiné-Bissau foram semelhantes aos identificados noutras regiões do continente africano. Observou-se também que os alelos S e R2 foram idênticos em *Anopheles arabiensis* e *An. gambiae* s.s.. Obbard *et al.* (2008) e White *et al.* (2011) sugeriram que os alelos resistentes surgiram por mutação a partir do alelo susceptível, pelo que se coloca a questão de esta semelhança alélica ser o resultado de um polimorfismo ancestral partilhado ou, pelo contrário, de uma mutação com uma origem única e posterior introgressão entre espécies. Rottschaefer *et al.* (2011) referiram que o facto de certos genes da imunidade do mosquito serem semelhantes entre taxa relativamente afastados, como *An. gambiae* s.s. e *An. merus*, indica a existência de polimorfismos ancestrais partilhados. No entanto, a evidência de que ocorre introgressão de diversas regiões genómicas entre *An. gambiae* s.s. e *An. arabiensis* (Besansky *et al.*, 2003), levou a que alguns autores (Slotman *et al.*, 2007; Rottschaefer *et al.*, 2011) assumissem a introgressão entre estas espécies como o mecanismo mais provável para a partilha de alelos em vários genes do sistema imune.

5. CONCLUSÃO

Este trabalho demonstrou pela primeira vez a presença de *Anopheles arabiensis* na região de Antula, Guiné-Bissau. Sendo um dos principais vectores de malária no continente africano, este resultado é importante para eventuais programas de controlo na região de Bissau, especialmente se se tiver em conta o potencial comportamento exofágico e exofílico demonstrado por esta população. A análise genética baseada em microssatélites presentemente em curso, poderá esclarecer sobre uma recente introdução da espécie nesta região, mas independentemente das conclusões, será fundamental a realização de levantamentos entomológicos nesta área, de modo a que se compreendam realmente quais os comportamentos desta população e que influência poderá esta ter na transmissão de malária na região de Antula.

Este trabalho demonstrou também uma elevada prevalência do alelo susceptível S1 e uma baixa prevalência dos alelos resistentes R1 e R2 do gene TEP1 de *Anopheles gambiae* s.l. na Guiné-Bissau. Apesar de presente em baixa frequência, demonstrou-se também a associação do alelo R1 com a forma M de *An. gambiae* s.s., tal como já tinha sido proposto anteriormente por White *et al.* (2011). A análise da diversidade do gene TEP1 revelou também a manutenção de uma elevada diversidade genética na forma M, contrastante com uma baixa diversidade na forma S. Estes dados estão de acordo com White *et al.* (2011), que frisaram a importância deste gene no processo de especiação incipiente de *An. gambiae* s.s., ao conferir uma maior adaptabilidade à forma M em criadouros com maior pressão de agentes patogénicos. Os problemas na análise molecular das larvas do criadouro permanente implicam a necessidade de se repetirem estas colheitas de modo a comparar-se os padrões de variação genética do TEP1 nos diferentes tipos de criadouro. Finalmente, os dados obtidos neste trabalho sobre o gene TEP1 servem como complemento importante para futuros trabalhos, quer na Guiné-Bissau, quer noutras regiões do continente Africano e nos quais seria interessante perceber de que modo é que a distribuição e a diversidade do gene TEP1 influenciam a transmissão de malária.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ayala, F.J., Escalante, A.A., Lal, A.A., & Rich, S.M., 1998. Evolutionary relationships of human malaria parasites. In: *Malaria: parasite biology, pathogenesis and protection*. Sherman, I.W. (Ed.), 5th Edition. American Society for Microbiology Press, Washington, pp.285-300.

Besansky, N.J., Powell, J.R., Caccone, A., Hamm, D.M., Scott, J.A. & Collins, J.A., 1994. Molecular phylogeny of the *Anopheles gambiae* complex suggests genetic introgression between principal malaria vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(15), pp.6885-6888.

Besansky, N.J., Lehmann, T., Fahey, G.T., Fontenille, D., Braack, L.E., Hawley, W.A. & Collins, F.H., 1997. Patterns of mitochondrial variation within and between African malaria vectors, *Anopheles gambiae* and *An. arabiensis*, suggest extensive gene flow. *Genetics*, 147(4), pp.1817-1828.

Besansky, N.J., Krzywinski, J., Lhemann, T., Simard, F., Kern, M., Mukabayire, O., Fontenille, D., Touré, Y. & Sagnon, N., 2003. Semipermeable species boundaries between *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis*: evidence for multilocus DNA sequence variation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(19), pp.10818-10823.

Besansky, N.J., Hill, C.A. & Costantini, C., 2004. No accounting for taste: host preference in malaria vectors. *Trends in Parasitology*, 20(6), pp.249-251.

BioGraphix, 2012. [online] Disponível em: <http://www.biographix.cz/portfolio/schemes-models/life-cycle-of-the-mosquito-anopheles-gambiae/> [acedido a 20 de Setembro de 2012].

Biswas, S. & Akey, J.M., 2006. Genomic insights into positive selection. *Trends in Genetics*, 22(8), pp.437-446.

- Black IV, W.C. & Lanzaro, G.C., 2001. Distribution of genetic variation among chromosomal forms of *Anopheles gambiae* s.s.: introgressive hybridization, adaptive inversions, or recent reproductive isolation? *Insect Molecular Biology*, 10(1), pp.3-7.
- Blandin, S., Wang-Sattler, R., Lamacchia, M., Gagneur, J., Lycett, G., Ning, Y., Levashina, E.A. & Steinmetz, L.M., 2009. Dissecting the genetic bases of resistance to malaria parasites in *Anopheles gambiae*. *Science*, 326(5949), pp.147-150.
- Blandin, S., Shiao, S.H., Moita, L.F., Janse, C.J., Waters, A.P., Kafatos, F.C. & Levashina, E.A., 2004. Complement-like protein TEP1 is a determinant of vectorial capacity in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Cell*, 116(5), pp.661-670.
- Braga, E.M. & Fontes, C.J.F., 2004. Plasmodium – Malária. In: *Parasitologia Humana*. Neves, D.P., Melo, A.L., Linardi, P.M. & Vitor (Eds.), R.W.A, 11ª Edição. Atheneu, São Paulo, pp.143-161.
- Caputo, B., Nwakanma, D., Jawara, M., Adiamoh, M., Dia, I., Konate, L., Petrarca, V., Conway, D.J. & della Torre, A., 2008. *Anopheles gambiae* complex along The Gambia river, with particular reference to the molecular forms of *An. gambiae* s.s.. *Malaria Journal*, 7:182.
- Caputo, B., Santolamazza, F., Vicente, J.L., Nwakanma, D.C., Jawara, M., Palsson, K., Jaenson, T., White, B.J., Mancini, E., Petrarca, V., Conway, D.J., Besansky, N.J., Pinto, J. & della Torre, A., 2011. The “far-west” of *Anopheles gambiae* molecular forms. *PLoS ONE*, 6(2), e16415.
- Chiodini, P.L., Moody, A.H. & Manser, D.W., 2001. Malaria parasites. In: *Atlas of Medical Helminthology and Protozoology*. 4th Edition. Churchill Livingstone, London, pp.61-69.
- Chirstophides, G.K., Zdobnov, E., Barillas-Mury, C., Birney, E., Blandin, S., Blass, C., Brey, P.T., Collins, F.H., Danielli, A., Dimopoulos, G., Hetru, C., Hoa, N.T., Hoffmann, J.A., Kanzok, S.M., Letunic, I., Levashina, E.A., Loukeris, T.G., Lycett, G., Meister, S., Michel, K., Moita, L.F., Müller, H.M., Osta, M.A., Paskewitz, S.M., Reichhart, J.M., Rzhetsky, A., Troxler, L., Vernick, K.D., Vlachou, D., Volz, J., von

Mering, C., Xu, J., Zheng, L., Bork, P. & Kafatos, F.C., 2002. Immunity-related genes and gene families in *Anopheles gambiae*. *Science*, 298(5591), pp.159-165.

CIA – The World Factbook, 2012. Central Intelligence Agency. [online] Disponível em: <https://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/geos/pu.html> [acedido a 11 de Abril de 2012].

Coetzee, M., Craig, M. & le Sueur, D., 2000. Distribution of African malaria mosquitoes belonging to the *Anopheles gambiae* complex. *Parasitology Today*, 16(2), pp.74-77.

Collins, F.H. & Paskewitz, S.M., 1996. A review of the use of ribosomal DNA (rDNA) to differentiate among cryptic *Anopheles* species. *Insect Molecular Biology*, 5(1), pp.1-9.

Coluzzi, M., Petrarca, V. & di Deco, M.A., 1985. Chromosomal inversion intergradation and incipient speciation in *Anopheles gambiae*. *Bolletino di zoologia*, 52:1-2, 45-63.

Coluzzi, M., Sabatini, A., Petrarca, V. & di Deco, M.A., 1979. Chromosomal differentiation and adaptation to human environments in the *Anopheles gambiae* complex. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 73(5), pp.483-497.

Dabiré, K.R., Diabaté, A., Agostinho, F., Alves, F., Manga, L., Faye, O. & Baldet, T., 2008. Distribution of the members of *Anopheles gambiae* and pyrethroid knock-down resistance gene (kdr) in Guinea-Bissau, West Africa. *Bulletin de la Société de pathologie exotique*, 101(2), pp.119-123.

della Torre, A., Merzagora, L., Powell, J.R., Coluzzi, M., 1997. Selective introgression of paracentric inversions between two sibling species of the *Anopheles gambiae* complex. *Genetic Society of America*, 146(1), pp.239-244.

- della Torre, A., Fanello, C., Akogbeto, M., Dossou-yovo, J., Favia, G., Petrarca, V., Coluzzi, M., 2001. Molecular evidence of incipient speciation within *Anopheles gambiae* s.s. in West Africa. *Insect Molecular Biology*, 10(1), pp.9-18.
- della Torre, A., Costantini, C., Besansky, N.J., Caccone, A., Petrarca, V., Powell, J.R., Coluzzi, M., 2002. Speciation within *Anopheles gambiae* – the glass is half full. *Science*, 298(5591), pp.115-117.
- della Torre, A., Tu, Z. & Petrarca, V., 2005. On the distribution and genetic differentiation of *Anopheles gambiae* s.s. molecular forms. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35(7), pp.755-769.
- Despommier, D.D., Gwadz, R.W., Hotez, P.J. & Knirsch, C., 2000. The Malaria. In: *Parasitic Diseases*. 5th Edition. Apple Trees Productions, New York, pp.50-68.
- Diabaté, A., Dabire, R.K., Kim, E.H., Dalton, R., Millogo, N., Baldet, T., Simard, F., Gimnig, J.E., Hawley, W.A. & Lehmann, T., 2005. Larval development of the molecular forms of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) in different habitats: a transplantation experiment. *Journal of Medical Entomology*, 42(4), pp.548-553.
- Diabaté, A., Dabire, R.K., Kangne, P., Brengues, C., Baldet, T., Ouari, Simard, F. & Lehmann, T., 2006. Mixed swarms of the molecular M and S forms of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) in sympatric area from Burkina Faso. *Journal of Medical Entomology*, 43(3), pp.480-483.
- Diabaté, A., Dabire, R.K., Heidenberger, K., Crawford, J., Lamp, W.O., Culler, L.E. & Lehmann, T., 2008. Evidence for divergent selection between the molecular forms of *Anopheles gambiae*: role of predation. *BMC Evolutionary Biology*, 8(5).
- Diabaté, A., Dao, A., Yaro, A.S., Adamou, A., Gonzalez, R., Manoukis, N.C., Traoré, S.F., Gwadz, R.W. & Lehmann, T., 2009. Spatial swarm segregation and reproductive isolation between the molecular forms of *Anopheles gambiae*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1676), pp.4215-4222.

- Fanello, C., Santolamazza, F. & della Torre, A., 2002. Simultaneous identification of species and molecular forms of the *Anopheles gambiae* complex by PCR-RFLP. *Medical and Veterinary Entomology*, 16(4), pp.461-464.
- Fettene, M., Koekemoer, L.L., Hunt, R.H. & Coetzee, M., 2002. PCR assay for identification of *Anopheles quadriannulatus* species B from Ethiopia and other sibling species of the *Anopheles gambiae* complex. *Medical and Veterinary Entomology*, 16(2), pp.214-217.
- Fonseca, L.F., di Deco, M.A., Carrara, G.C., Dabo, I., do Rosário, V. & Petrarca, V., 1996. *Anopheles gambiae* complex (Diptera:Culicidae) near Bissau City, Guinea Bissau, West Africa. *Journal of Medical Entomology*, 33(6), pp.939-945.
- Fu, Y.X. & Li, W.H., 1992. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics*, 133(3), 693-709.
- Fu, Y.X., 1995. Statistical properties of segregating sites. *Theoretical Population Biology*, 48(2), pp.172-197.
- Fu, Y.X., 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147(2), pp.915-925.
- Gelfand, H.M., 1955. *Anopheles gambiae* Giles and *Anopheles melas* Theobald in a coastal area of Liberia, West Africa. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 49(6), pp.508-527.
- Gentile, G., Slotman, M., Ketmaier, V., Powell, J.R., Caccone, A., 2001. Attempts to molecularly distinguish cryptic taxa in *Anopheles gambiae* s.s.. *Insect Molecular Biology*, 10(1), pp.25-32.
- Gillies, M.T. & Meillon, B. De, 1968. *The Anophelinae of Africa South of the Sahara (Ethiopian Zoogeographical Region)*. Publications of the South African Institute for Medical Research, Johannesburg, 343pp.
- Gillies, M.T. & Coetzee, M., 1987. *A Supplement to the Anophelinae of Africa South of the Sahara (Afrotropical Region)*. Publications of the South African Institute for Medical Research, Johannesburg, 143pp.

- Harbach, R.E., 2011. Genus ANOPHELES Meigen, 1818. Mosquito Taxonomic Inventory. [online] Disponível em: <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/genus-anopheles-meigen-1818> [acedido a 20 de Setembro de 2012].
- Hillyer, J.F., 2010. Mosquito Immunity. In: *Invertebrate Immunity*. Söderhäll, K. (Ed.). Springer, New York, pp.218-238.
- Hervy, J.-P., Le Goff, G., Geoffroy, B., Hervé, J.-P., Manga, L. & Brunhes, J., 1998. Logiciel d'identification et dénombrement: les anophèles de la région afro-tropicale. ORSTOM. CD-ROM
- Hunt, R.H., Coetzee, M. & Fettene, M., 1998. The *Anopheles gambiae* complex: a new specie from Ethiopia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 92(2), pp.231-235.
- IBM Corp. Released, 2011. *IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0*. Armonk, NY: IBM Corp.
- Jaenson, T.G.T., Gomes, M.J., Barreto dos Santos, R.C., Petrarca, V., Fortini, D., Evora, J. & Crato, J., 1994. Control of endophagic *Anopheles* mosquitoes and human malaria in Guinea Bissau, West Africa by permethrin-treated bed nets. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 88(6), pp.620-624.
- Jukes, T.H. & Cantor, C.R., 1969. Evolution of protein molecules. In: *Mamalian protein metabolism*. Munro, H.N. (Ed.). Academic Press, New York, pp.21-132.
- Kirby, M.J. & Lindsay, S.W., 2009. Effect of temperature and inter-specific competition on the development and survival of *Anopheles gambiae sensu stricto* and *An. arabiensis* larvae. *Acta Tropica*, 109(2), pp.118-123.
- Kirkwood, B.R., 1988. *The Essentials of Medical Statistics*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Krzywinski, J. & Besansky, N.J., 2003. Molecular systematics of *Anopheles*: from subgenera to subpopulations. *Annual Review of Entomology*, 48, pp.111-139.

- Lehmann, T. & Diabaté, A., 2008. The molecular forms of *Anopheles gambiae*: a phenotypic perspective. *Infection, Genetics and Evolution*, 8(5), pp.737-746.
- Levashina, E.A., Moite, L.F., Blandin, S., Vriend, G., Laqueux, M. & Kafatos, F.C., 2001. Conserved role of a complement-like protein in phagocytosis revealed by dsRNA knockout in cultured cells of the mosquito, *Anopheles gambiae*. *Cell*, 104(5), pp.709-718.
- Librado, P. & Rozas, J., 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11), pp.1451-1452.
- Manson-Bahr, P.E.C. & Bell, D.R., 1897. Malaria and babesiosis. In: *Manson's Tropical Diseases*. 19th Edition. Baillière Tindall, Great Britain, pp.3-51.
- Marsden, C.D., Lee, Y., Nieman, C.C., Sanford, M.R., Dinis, J., Martins, C., Rodrigues, A., Cornel, A.J. & Lanzaro, G.C., 2011. Asymmetric introgression between the M and S forms of the malaria vector, *Anopheles gambiae*, maintains divergence despite extensive hybridization. *Molecular Ecology*, 20(23), pp.4983-4994.
- Meiklejohn, C.D., Kim, Y., Hartl, D.L. & Parsch, J., 2004. Identification of a Locus Under Complex Positive Selection in *Drosophila simulans* by Haplotype Mapping and Composite-Likelihood Estimation. *Genetics*, 168(1), pp.265-279.
- Nei, M. & Tajima, F., 1980. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics*, 97(1), pp.145-163.
- Nei, M. & Miller, J.C., 1990. A simple method for estimating average number of nucleotide substitutions within and between populations from restriction data. *Genetics*, 125(4), pp.873-879.
- Obbard, D.J., Callister, D.M., Jiggins, F.M., Soares, D.C., Yan, G. & Little, T.J., 2008. The evolution of TEPI1, an exceptionally polymorphic immunity gene in *Anopheles gambiae*. *BMC Evolutionary Biology*, 8:274.
- Oliveira, E., Salgueiro, P., Palsson, K., Vicente, J.L., Arez, A.P., Jaenson, T.G., Caccone, A. & Pinto, J., 2008. High levels of hybridization between molecular forms of

Anopheles gambiae from Guinea Bissau. *Journal of Medical Entomology*, 45(6), pp.1057-1063.

Paaijmans, K.P., Huijben, S., Githeko, A.K. & Takken, W., 2009. Competitive interactions between larvae of the malaria mosquitoes *Anopheles arabiensis* and *Anopheles gambiae* under semi-field conditions in western Kenya. *Acta Tropica*, 109(2), pp.124-130

Palsson, K., Pinto, J., do Rosário, V. & Jaenson, T.G., 1998. The palpal ratio method compared with PCR to distinguish between *Anopheles gambiae* s.s. and *A.melas* from Guinea Bissau, West Africa. *Acta Tropica*, 70(1), pp.101-107.

Palsson, K., Jaenson, T.G.T., Dias, F., Laugen, A.T., Björkman, A., 2004. Endophilic *Anopheles* mosquitoes in Guinea Bissau, West Africa, in relation to human housing conditions. *Journal of Medical Entomology*, 41(4), pp.746-752.

Petrarca, V., Carrara, G.C., di Deco, M.A. & Petrangeli, G., 1983. Il complesso *Anopheles gambiae* in Guinea Bissau. *Parassitologia*, 25(1), 29-39.

Preacher, K. J., 2001. Calculation for the chi-square test: An interactive calculation tool for chi-square tests of goodness of fit and independence [Computer software]. Disponível em: <http://quantpsy.org> [acedido a 24 de Setembro de 2012].

Presidência da República da Guiné-Bissau, 2012. [online] Disponível em <http://www.presidencia-gw.org/index.html> [acedido a 11 de Abril de 2012].

Richards O.W. & Davies R.G., 1977. *Imm's general book of entomology II: General classification and biology*. Chapman and Hall, New York, 1354pp.

Rottschaefer, S.M., Riehle, M.M., Coulibaly, B., Sacko, M., Niaré, O., Morlais, I., Traoré, S.F., Vernick, K.D. & Lazzaro, B.P., 2011. Exceptional diversity, maintenance of polymorphism, and recent directional selection on the APL1 malaria resistance genes of *Anopheles gambiae*. *PLoS Biology*, 9(3), e1000600.

- Sadava, D., Heller, H.C., Orians, G.H., Purves, W.K. & Hillis, D.M., 2008. The Mechanisms of Evolution. In: *Life, The Science of Biology*. 8th Edition. Sinauer Associates & W.H. Freeman and Company, USA, pp.486-507.
- Santolamazza, F., Mancini, E., Simard, F., Qi, Y., Tu, Z. & della Torre, A., 2008. Insertion polymorphism of *SINE200* retrotransposons within speciation islands of *Anopheles gambiae* molecular forms. *Malaria Journal*, 7:163.
- Sauer, P., Müller, M. & Kang, J., 1998. Quantification of DNA. *Qiagen News*, 2, pp.23-26.
- Schneider, P., Takken, W. & McCall, P.J., 2001. Interspecific competition between sibling species larvae of *Anopheles arabiensis* and *An.gambiae*. *Medical and Veterinary Entomology*, 14(2), pp.165-170.
- Scott, J.A., Brogdon, W.G. & Collins, F.H., 1993. Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 49(4), pp.520-529.
- Service, M.W., 1993. Mosquitos (Culicidae). In: *Medical insects and arachnids*. Lane, R.P. & Crosskey, R.W. (Eds.). Chapman and Hall, London, pp.120-240.
- Sinka, M.E., Bangs, M.J., Manquin, S., Coetzee, M., Hemingway, J., Patil, A.P., Temperley, W.H., Gething, P.W., Kabaria, C.W., Okara, R.M., Van Boeckel, T., Godfray, H.C., Harbach, R.E & Hay, S.I., 2010. The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in Africa, Europe and the Middle East: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. *Parasites and Vectors*, 3:117.
- Sinka, M.E., Bangs, M.J., Manquin, S., Rubio-Palis, Y., Coetzee, M., Chareonviriyaphap, T., Mbogo, C.M., Hemingway, J., Patil, A.P., Temperley, W.H., Gething, P.W., Kabaria, C.W., Burkot, T.R., Harbach, R.E & Hay, S.I., 2012. A global map of dominant malaria vectors. *Parasites and Vectors*, 5:69.
- Slotman, M.A., Parmakelis, A., Marshall, J.C., Awono-Ambene, P.H., Antonio-Nkondjo, C., Simard, F., Caccone, A. & Powell, J.R., 2007. Patterns of Selection in

Anti-Malarial Immune Genes in Malaria Vectors: Evidence for Adaptive Evolution in LRIM1 in *Anopheles arabiensis*. *PLoS ONE*, 2(8), e793.

Sokal, R. & Rohlf, F., 1981. *Biometry*. 2nd Edition. W. H. Freeman and Company, San Francisco, 859pp.

Sousa, C.A., Pinto, J., Almeida, P.A., Ferreira, C., do Rosário, V.E. & Charlwood, J.D., 2001. Dogs as a favored host choice of *Anopheles gambiae sensu stricto* (Diptera: Culicidae) of São Tomé West Africa. *Journal of Medical Entomology*, 38(1), pp.122-125.

Tajima, F., 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3), pp.585-595.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S., 2011. Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10), pp.2731-2739.

Technonaturalist, 2012. [online] Disponível em: <http://technonaturalist.net/tags/biology> [acedido a 20 de Setembro de 2012].

The malERA Consultative Group on Vector Control, 2011. A research agenda for malaria eradication: vector control. *PLoS Medicine*, 8(1), e1000401.

Townson, H. & Onapa, A.W., 1994. Identification by rDNA-PCR of *Anopheles bwambae*, a geothermal spring species of the *An. gambiae* complex. *Insect Molecular Biology*, 3(4), pp.279-282.

Turner, T.L., Hahn, M.W. & Nuzhdin, S.V., 2005. Genomic islands of speciation in *Anopheles gambiae*. *PLoS Biology*, 3(9), e285.

White, B.J., Cheng, C., Simard, F., Costantini, C., Besansky, N.J., 2010. Genetic association of physically unlinked islands of genomic divergence in incipient species of *Anopheles gambiae*. *Molecular Ecology*, 19(5), pp.925-939.

- White, B.J., Lawniczak, M.K., Cheng, C., Coulibaly, M.B., Wilson, M.D., Sagnon, N., Costantini, C., Simard, F., Christophides, G.K. & Besansky, N.J., 2011. Adaptive divergence between incipient species of *Anopheles gambiae* increases resistance to *Plasmodium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(1), pp.244-249.
- White, G.B., 1985. *Anopheles bwambiae* sp.n., a malaria vector in the Semliki Valley, Uganda, and its relationships with other sibling species of the *An.gambiae* complex (Diptera: Culicidae). *Systematic Entomology*, 10(4), pp.501-522.
- Wirth, D.F., 2002. The parasite genome: biological revelations. *Nature*, 419, pp.495-496.
- WHO, 2003. *Malaria entomology and vector control*. Part I. Learner's Guide. World Health Organization, Geneva, 107pp.
- WHO, 2011. *World Malaria Report 2011*. World Health Organization, Geneva, 246pp.
- WHO, 2012. *Global plan for insecticide resistance management in malaria vectors*. World Health Organization, Geneva, 130pp.
- Wilkins, E.E., Howell, P.I & Benedict, M.Q., 2006. IMP PCR primers detect single nucleotide polymorphism for *Anopheles gambiae* species identification, Mopti and Savanna rDNA types, and resistance to dieltrin in *Anopheles arabiensis*. *Malaria Journal*, 5:125.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Ciclo de vida dos parasitas responsáveis pela malária humana.....	3
Figura 1.2. Ciclo de vida dos mosquitos do género <i>Anopheles</i> (Diptera: Culicidae).....	4
Figura 1.3. Quadro com as características da morfologia externa de um anofelíneo fêmea adulto; com as principais diferenças entre a cabeça de uma fêmea e de um macho anofelíneos; e principais diferenças no posicionamento entre larvas e adultos de culicíneos e anofelíneos.....	5
Figura 1.4. Distribuição geográfica dos membros do complexo <i>Anopheles gambiae</i> (Diptera: Culicidae).....	9
Figura 1.5. Esquema do sistema imunitário do mosquito (Diptera: Culicidae).....	17
Figura 2.1. Localização geográfica da República da Guiné-Bissau no continente africano e mapa do país.....	22
Figura 2.2. Localização geográfica de Antula e do centro da cidade de Bissau, Guiné-Bissau.....	23
Figura 2.3. Localização dos locais de captura de culicídeos em Antula, Guiné-Bissau.....	24
Figura 2.4. Identificação de espécies e formas moleculares do complexo <i>An. gambiae</i> , por PCR-RFLP.....	27
Figura 2.5. Identificação das formas moleculares <i>An. gambiae</i> s.s. por amplificação do retrotransposão SINE200X1.6.....	27
Figura 3.1. Frequência de espécies e formas moleculares por estado larvar nos criadouros temporários.....	38
Figura 3.2. Genótipos representativos do gene TEP1 identificados em larvas e adultos de <i>An. gambiae</i> s.s.....	40
Figura 3.3. Variação da diversidade haplotípica (<i>Hd</i>) do gene TEP1 entre larvas e adultos das diferentes formas moleculares de <i>An. gambiae</i> s.s.....	41
Figura 3.4. Variação da diversidade nucleotídica nas posições não-sinónimas (π_{ns}) do gene TEP1 entre larvas e adultos das diferentes formas moleculares de <i>An. gambiae</i> s.s.....	42

Figura 3.5. Árvore filogenética entre as sequências obtidas neste estudo e sequências do gene TEP1 anotadas no GenBank.....43

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1. Tamanho dos fragmentos de restrição do gene TEP1 para cada enzima e genótipo correspondente.....	30
Tabela 3.1. Número de larvas capturadas em Antula, por tipo de criadouro e estado larvar (L1 a L4).....	35
Tabela 3.2. Concentração e grau de pureza do DNA extraído.....	36
Tabela 3.3. Frequência de cada espécie/forma molecular por local de colheita, no caso das larvas ou método de colheita, no caso dos adultos.....	36
Tabela 3.4. Comparação entre os marcadores IGS e SINE200X1.6 para a identificação de formas moleculares de <i>An. gambiae s.s.</i>	37
Tabela 3.5. Frequência de cada genótipo e de cada alelo do gene TEP1 para as larvas de <i>An. gambiae s.s.</i> e de <i>An. arabiensis</i>	39
Tabela 3.6. Polimorfismo, diversidade haplotípica e diversidade nucleotídica do gene TEP1 e testes de selecção.....	41